

Vol. X, No. 1.

October, 1928

QP
501
J67

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; KIKO GOTO, Kyoto; MOTONOSUKE GOTO, Fukuoka; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo; SHIGERU TODA, Hoten; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

TOKYO

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY.

11 Itchome Kagacho, Ushigome.

Price { ¥10.00 per volume, Nippon.
\$ 5.50 per volume, other countries.

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; MOTONOSUKE GOTO, Fukuoka; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo; SHIGERU TODA, Hoten; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME X

TOKYO

1928-1929

COPYRIGHT 1929

BY

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

PUBLISHED BY THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

CONTENTS OF VOLUME X.

No. 1, October, 1928

	Page
OGAWA, Iwao and KODAMA, Keizo. A new micro-method for the determination of blood sugar	1
KOMORI, Yutaka, IWAO Chuji und NAKAMURA, Hideo. Über die Bilirubinbildungsfähigkeit der Hundemilz in vivo	11
OKAMURA, Takeji. Über die Bufodesoxycholsäure (II)	15
NAGEYAMA,, Takeyoshi, MACHIDA, Hikosaburo, and TAKEDA, Yoshio. Studies in experimental scurvy. II. The carbohydrate metabolism of the animal fed on a vitamin C free diet	17
NAGAYAMA, Takeyoshi and SATO, Noboru. Studies in experimental scurvy. III. The nitrogen metabolism of the animal fed on a vitamin C free diet	27
ONIZAWA, Jinye. Studies on the behavior of cholesterol within the animal body. I. A method recommendable for cholesterol estimation in any kind of tissue	45
HURUYA, Atusi. Studies on the phosphorus intoxication of rabbits...	63
KAWASHIMA, Shin-ichi and IWANAGA, Yoshio. Die hemmende Wirkung der Splanchnicotomie auf die Atropinglykämie	97
EDA, Genichiro. Über den Einfluss des Ergotamins auf den Blutzucker-gehalt	101
SHIKATA, Masuzo and TACHI, Isamu. On the influence of the ammonium ion on the quinhydrone electrode potential	115
INOUE, Kentaro. Die pH-Abhängigkeit der Glycerophosphatase	133
KOBAYASHI, Hideo. Die Kataphorese der Glycerophosphatase	147
ASAKAWA, Katsura. Über die Nierenglycerophosphatase	157
IZUME, Seiichi, YOSHIMARU, Yoshinori and KOMATSUBARA, Isao. Studies on experimental rickets. II. The influence of ultra-violet irradiation on the antirachitic value of soybean oil	177
KARASHIMA, Junji. Über das Vorkommen des β -Stearodipalmitins in der Rinderthymus	183
KAMEI, Terumi. Zur Kenntnis der vergleichenden Biochemie. IV. Über das Verhalten der Amidobenzoensäuren im Organismus der niederen Tiere	189

No. 2, January, 1929

KITAGAWA, Matsunosuke. On the influence of hydrogen-ion concentration upon the inactivation of urease by some heavy metal salts	197
KIMURA, Hideo. Studies über die fermentative Spaltung der Acetyl-, Formyl-, und Benzoylderivate der Aminosäuren	207

KIMURA, Hideo. Weitere Studien über die fermentative Spaltung der Acetyl-, Formyl, und Benzoylderivate der Aminosäuren	225
HIROHATA, Ryozo. Studies on protamine (I)	251
YASUDA, Morio. Über das Wesen der Salzhydrolyse der Stärke betrachtet im Lichte der Salzwirkung auf die Bakterienentwicklung..	259
KAWAI, Tsutomu. Über Wirkung der proteolytischen Fermente auf die Benzoyl- und Desaminoderivate der Polypeptide	277
JONO, Yutaka. Über die chemische Zusammensetzung der menschlichen Epidermis	311
KAWAI, Hashime. Studies on the hematoporphyrin hemolysis	325
TOMITA, Masaji. Beiträge zur Embryochemie der Reptilien	351
NAKAMURA, Yasuo. Über das Verhalten des im Reptilienei vorhandenen Reststickstoffes bei der Bebrütung	357
SENDJU, Yuzo. Über die Bildung von d-Milchsäure bei der Bebrütung von Meerschildkröteneiern	361
SENDJU, Yuzo. Über das Verhalten der lebenswichtigen Aminosäuren bei der Bebrütung des Meerschildkröteneies	365
KARASHIMA, Junji. Über das Verhalten der anorganischen Bestandteile bei der Bebrütung des Meerschildkröteneies	369
KARASHIMA, Junji. Über das Verhalten der Fette bei der Bebrütung von Meerschildkröteneiern	375
SAGARA, Jun-ichiro. Über Fermente im Meerschildkrötenei	379

No. 3, April, 1929

HOSOYA, Nobuo. Beiträge zur Wirkung des Insulins bei gleichzeitiger Anwendung von Blausäure	383
KARAZAWA, Sugizo. Über den experimentellen Versuch des Blut-ammoniak	389
INOUE, Kentaro. Über die Wirkung der Elektrolyten auf die Glycero-phosphatase	395
ONIZAWA, Jinye. Studies on the behavior of cholesterol within the animal body.	
II. The content of free and ester cholesterol in various tissues of normal rabbit	409
III. The influence of various autonomous nervous poisons on the content of cholesterol in each organ and tissue	413
IV. The rôle of thyroid gland on the content of cholesterol in each organ and tissue	425
YOSHIMURA, Shigeo. Über das Allantoin in der Galle des Hundes....	435
TAKAHASHI, Masao. Über das Verhalten des Ovomukoides und Cholins bei der Bebrütung des Meerschildkröteneies	443
TAKAHASHI, Masao. Über das Verhalten der Hexon- und Purinbasen,	

Contents

v

die während der Bebrütung in freier Form im Hühnerei vorhanden sind.	451
TAKAHASHI, Masao. The fate of hippuric acid in the chicken organism	457
OKUYAMA, Daisaburo. Studies on tyrosinase. I. The oxidation and reduction potential of the tyrosinase system	463
YAMAZAKI, Kageyu. Biochemical studies on the auriculoventricular junctional system of heart. I. The glycogen content	481



Digitized by the Internet Archive
in 2024

A NEW MICRO-METHOD FOR THE DETERMINATION OF BLOOD SUGAR.*

By

IWAO OGAWA AND KEIZO KODAMA.

(From the Biochemical Laboratory, Aichi Medical College, Nagoya.)

(Received for publication, June 10, 1928.)

Although several micro-methods for the determination of blood sugar are known, most of them require some technical skill, which is often filled with difficulties for those who are not very familiar with chemical analysis. The purpose of this communication is to describe an exceedingly simple method, by which the content of blood sugar can be determined in an amount of blood as low as 0.05–0.1 cc. with satisfactory accuracy.

Principle:— The blood is deproteinised by acetic acid and potassium ferricyanide, alkalised with sodium carbonate and then boiled. Ferricyanide is thus reduced to ferrocyanide, the amount of which is parallel to the amount of sugar present. After it is cooled, FeCl_3 -solution, acidulated with acetic acid, is added and the blue colour, due to the formation of prussian-blue, is compared with the standard, which is obtained with the known amount of glucose treated in the same manner as with blood.

Reagents:—

- 1) 0.3% acetic acid.
- 2) 1/200 mol. ferricyanide solution.

1.646 gm. of pure potassium ferricyanide (Kahlbaum) are dissolved in 1 liter of distilled water. The salt should be free from ferro compounds which can be detected by a trace of blue colour on the addition of ferric chloride solution (4).

* This paper was read before the November meeting of Aichi Medical College, 1927.

- 3) 10% Na_2CO_3 solution,
10 gm. of pure carbonate (anhydrid) are dissolved in 100 cc. of distilled water. The solution itself should not cause any reduction.
- 4) Ferric chloride solution,
1.65 gm. of ferric chloride are dissolved in 1 liter of 30% acetic acid solution.
- 5) Standard glucose solution,
1 gm. of pure glucose, exactly weighed out, is dissolved in 100 cc. of saturated NaCl-solution. This must be preserved in the ice chest and 1 cc. of this stock solution is diluted to 100 cc. with distilled water before the use.

Procedure:— The blood is collected in a small dry porcelain crucible, containing a trace of finely powdered potassium oxalate. Usually 5 drops are sufficient for duplicate determinations. The blood is then drawn into a straight calibrated pipette of 0.1 cc. up to 0.05 or 0.1 according to the concentration of sugar in the blood and blown out into a test tube containing 5 cc. of 0.3% acetic acid (1). The pipette is washed out several times with this acid. Then the whole solution is made up to 6.0 cc. by adding distilled water. Into another test tube are pipetted 5.0 cc. of 0.3% acetic acid and 1 cc. of the diluted standard sugar solution (5). Both tubes are placed in a boiling water bath for 3 minutes and then cooled in running water. Then 3 cc. of the ferri-cyanide solution (2) are added and mixed well with the contents. After standing for a few minutes the solution containing the blood is filtered through the Wattman filter paper (7 mm. diameter). The filtrate thus obtained should be perfectly clear. 5.0 cc. of this filtrate and of the standard solution are pipetted into dry clean test tubes and mixed with 1.0 cc. of sodium carbonate solution (3) respectively. After it is well mixed the tubes are placed again in a boiling water bath for 6 minutes. Then the tubes are cooled in water and to each 1 cc. of ferric chloride solution (4) is added by means of a pipette. The blue

colours thus developed are compared with the colorimeter. In this case it will be found convenient to use the brown colour screen, if necessary, to filter off the yellow nuance due to the excess of the ferricyanide.

The calculation is very simple. If the ratio of the colorimetric readings of the unknown solution to that of the standard be a/b , then $a/b \times 0.1$ gives the concentration of glucose in gm. per 100 cc. of the blood when 0.1 is taken for analysis.

EXPERIMENTS.

1) *With pure glucose.* According to Hagedorn and Jensen (1923) the amount of ferri-cyanide reduced by glucose is exactly parallel to the concentration of glucose. This statement was also verified by the experiments carried out with pure glucose in the same manner as described above. The experimental results are given in Table I. where the values in the third column were calculated using the solution containing 1.0 of the glucose solution as standard.

TABLE I.
The experiment with pure glucose.

The amount of sugar solution (0.01%) taken for analysis in cc.	Colorimetric reading	The amount of sugar found
0.2	50.0	0.200
0.4	24.9	0.410
0.6	16.6	0.602
0.8	12.5	0.800
1.0	10.0	1.000

2) *With blood.*—With various samples of blood from rabbits the determination were carried out with the authors' method and at the same time with the method of Hagedorn and Jensen. The results obtained by both methods are indicated in Table II.

TABLE II.
The experiment with blood.

No. of rabbit	The concentration of blood sugar	
	Hagedorn-Jensen	Ogawa-Kodama
1	0.115	0.115
2	0.110	0.108
3	0.155	0.160
4	0.110	0.109
5	0.117	0.114
6	0.125	0.129
7	0.111	0.114
8	0.106	0.109

Though there is a tendency to give a slightly higher value by the authors' method, yet the deviation is inconsiderable.

CONCLUSION.

A new colorimetric determination of blood sugar is described.

REFERENCE.

Hagedorn and Jensen (1923): Biochem. Zeit., **135**, 46.

ÜBER DIE BUFODESOXYCHOLSÄURE (II).

VON

TAKEJI OKAMURA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Okayama.

Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 20. Juni 1928).

In der ersten Mitteilung (1928) habe ich die Herstellung und die Eigenschaften der Bufodesoxycholsäure $C_{24}H_{40}O_4$ und Bufodehydrodesoxycholsäure $C_{24}H_{36}O_4$ dargelegt.

Dabei habe ich bemerkt, dass die Bufodesoxycholsäure äusserst schwer kristallisierbar und als Diketosäure $C_{24}H_{36}O_4$ identifiziert worden ist. Hier habe ich weiter ihren Äthylester mit Schmelzpunkt 171° – $173^{\circ}C$ und Methylester mit Schmelzpunkt $167^{\circ}C$ hergestellt und als Diketosäure mit Sicherheit festgestellt. Aus der Bufodesoxycholsäure entsteht bei der Oxydation mit Chromsäureanhydrid eine Diketosäure mit Schmelzpunkt $230^{\circ}C$, die ich α -Bufodehydrodesoxycholsäure nennen will. Diese Säure ist aber eine ziemlich unbeständige Verbindung wie die α -Hyodehydrodesoxycholsäure von Windaus (1926) und lagert sich leicht in eine neue Diketosäure $C_{24}H_{36}O_4$ mit Schmelzpunkt $251^{\circ}C$ um, die ihrerseits als β -Bufodehydrodesoxycholsäure bezeichnet werden soll. Aus Alkohol lässt sich die α -Diketosäure unverändert umkristallisieren, dagegen wird sie bei kurzem Erwärmen mit Eisessig verändert. Es scheint also, dass die α -Diketosäure unter der Clemmensenschen Reduktion rasch in die β -Säure umgelagert und dabei neue Cholansäure gewonnen wird. Die aus den beiden α - und β -Säuren bereiteten Äthylester von der Formel $C_{26}H_{40}O_4$ sind verschieden, der Ester der β -Säure ist auch hier der stabilere.

Bei der Clemmensenschen Reduktion der α -Diketosäure wird die neue Bufocholansäure galiefert, die bei $236^{\circ}C$ schmilzt und die spezifische Drehung $(\alpha)_D^{25} = -20,27$ hat. Ihr Äthylester von der Formel $C_{26}H_{44}O_2$ schmilzt bei 108° – $111^{\circ}C$ und ist auch hier

der stabilere. Bei der Oxydation der α -Bufodehydrodesoxycholsäure mit Kaliumhypobromit erhält man Ketotricarbonsäure, die in Nadeln kristallisiert und bei 217–218°C schmilzt. Diese Säure ist weder identisch mit der Desoxybiliansäure noch mit der Desoxyisobiliansäure.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Bufodehydrodesoxycholsäureäthylester.

Es wurde die Bufodehydrodesoxycholsäure in absolutem Äthylalkohol gelöst und trockenes Salzsäuregas in die Lösung bis zur Sättigung eingeleitet. Dabei schied sich eine Kristallmasse aus, die aus verdünntem Alkohol umkristallisiert wurde. Sie kristallisiert in Tafeln und schmilzt bei 171–173°C.

0,105 g Substanz gaben 0,288 g CO₂ und 0,0928 g H₂O.

C₂₆H₄₀O₄ Ber. C 74,95% H 9,68%

 Gef. C 74,80% H 9,88%

Bufodehydrodesoxycholsäuremethylester.

Der Methylester wurde in der üblichen Weise mittels Einleiten von trockenem Salzsäuregas in eine methylalkoholische Lösung bereitet. Der Methylester kristallisiert in Nadeln und schmilzt bei 167°C.

0,121 g Substanz gaben 0,33 g CO₂ und 0,0104 g H₂O.

C₂₅H₃₈O₄ Ber. C 74,58% H 9,52%

 Gef. C 74,38% H 9,66%

β -Bufodehydrodesoxycholsäure. C₂₄H₃₆O₄.

Die α -Säure mit Schmelzpunkt 230°C ist in der ersten Mitteilung beschrieben.

Ihre Überführung in die β -Säure geschieht folgendermassen: 1 g α -Säure wird in 20 ccm Eisessig gelöst, die Lösung wird mit 1 ccm konz. Salzsäure versetzt und eine Stunde unter Rückfluss gekocht. Nach vorsichtigem Zusetzen von Wasser fällt die β -Säure

in Nadeln aus, die nach dem Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol bei 251°C schmelzen.

Lösungsmitteln gegenüber verhält sie sich wie die α -Säure.

0,1341 g Substanz gaben 0,2827 g CO₂ und 0,0875 g H₂O.

C₂₄H₃₆O₄ Ber. C 74,17% H 9,34%

Gef. C 74,06% H 9,45%

β -Bufodehydrodesoxycholsäureäthylester.

Der Äthylester der α -Säure, der bei 171–173°C schmilzt, ist schon erwähnt.

Der Äthylester der β -Säure wurde in der üblichen Weise mittels Einleitens von trockenem Salzsäuregas bereitet.

Er kristallisiert aus verdünntem Alkohol in Nadeln mit Schmelzpunkt 228°C.

0,1105 g Substanz gaben 0,3032 g CO₂ und 0,0982 g H₂O.

C₂₆H₄₀O₄ Ber. C 74,95% H 9,68%

Gef. C 74,83% H 9,94%

Bufocholansäure. C₂₄H₄₀O₂.

Eine Lösung von 2 g α -Bufodehydrodesoxycholsäure in 100 cem Eisessig wurde auf 20 g amalgamiertes Zink gegossen, bis zu lebhaftem Sieden erhitzt und allmählich mit einem Gemisch von 100 cem konzentrierter Salzsäure und 50 cem Eisessig versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht stehen gelassen, dann vorsichtig bis zur Trübung mit Wasser versetzt und wiederum über Nacht stehen gelassen.

Da schied sich die Säure in feinen Nadeln ab, die nach mehrmaliger Umkristallisation aus Eisessig bei 236°C schmelzen, in Alkohol schwer löslich sind. Die Ausbeute beträgt ca. 50%.

Die spezifische Drehung ist folgende:

$$0,74 \text{ g Substanz, } 99\% \text{ Alkohol, } (\alpha)_D^{25} = \frac{0,15 \times 100}{0,74 \times 1} = -20,27.$$

0,1037 g Substanz gaben 0,303 g CO₂ und 0,0828 g H₂O.

C₂₄H₄₀O₂ Ber. C 79,93% H 11,19%

Gef. C 79,77% H 11,18% (Wieland 1912)

Während die Cholansäure aus Cholsäure optisch rechtsdrehend ist, zeigt die Bufocholansäure linksdrehende Eigenschaften.

Aber der absolute Wert der spezifischen Drehung ist fast derselbe wie von Cholansäure aus Cholsäure.

Bufocholansäureäthylester.

Der Ester wurde in der üblichen Weise durch Einleiten von Salzsäuregas in die alkoholische Lösung der Bufocholansäure hergestellt. Er kristallisiert aus verdünntem Alkohol in Nadeln und schmilzt bei 108–111°C.

0,098 g Substanz gaben

0,288 g CO₂ und 0,0987 g H₂O.

C₂₆H₄₄O₂ Ber. C 80,37% H 11,42%

Gef. C 80,14% H 11,26%

Ketotricarbonsäure. C₂₄H₃₆O₇.

2 g reine fein gepulverte α -Bufodehydrodesoxycholsäure wurden mit N/10 NaOH neutralisiert und an Wasser wurden der Lösung bis 80 ccm zugesetzt.

Die so erhaltene Lösung wurde in eine aus 8 g Kaliumhydroxyd, 8 g Brom und 80 ccm Wasser bereitete Hypobromitlauge gegossen; darauf fügte man zu dem Ganzen unter 0°C 340 ccm Wasser hinzu und liess es über Nacht bei 5°C stehen.

Dann wurde das überschüssige Hypobromit mit schwefliger Säure reduziert, die entstandene Ketotricarbonsäure mit verdünnter Salzsäure ausgefällt, abgesaugt und sorgfältig mit Wasser gut gewaschen. Sie wurde in verdünnter Essigsäure heiss gelöst; beim Abkühlen schied sich die Ketotricarbonsäure in Nadeln aus und die abgeschiedenen Kristalle wurden abgesaugt.

Die Ausbeute beträgt ca. 1,2 g. Der aus verdünntem Eisessig mehrmahls umkristallisierte Kristall schmilzt bei 217–218°C.

Titration.

0,04 g Substanz brauchten 2,82 ccm N/10 NaOH.

Äquivalent für $C_{24}H_{36}O_7$.

Ber. 436.

Gef. 446.

Analyse.

0,1015 g Substanz gaben 0,2455 g CO_2 und 0,0771 g H_2O .

$C_{24}H_{36}O_7$ Ber. C 66,01% H 8,31%

Gef. C 65,96% H 8,5%

Zum Schlusse spreche ich Herrn Prof. Dr. T. Schimizu meinen herzlichen Dank für die so freundliche Leitung meiner Arbeit aus.

Auch Herrn Dr. S. Yonemura möchte ich hier meinen besten Dank für seine trefflichen Ratschläge abstaten.

Ebenso danke ich dm Teikokugakushiin ergebenst für das gewährte Stipendium.

LITERATUR.

Borsche, W. u. Rosenkranz, E., B. **52**, 342. (1919).

Kaziro, K. u. Karasawa, R., Journ. of Biochem. **5**, 33. (1925).

Okamura, T., Journ. of Biochem. **8**, 351. (1928).

Windaus, A., Ann. **447**, 233. (1926).

Windaus, A. und Bohne, A., Ann. **433**, 278. (1923).

Wieland, H. und Weil, F. J., H. **80**, 287. (1912).

ÜBER DIE BILIRUBINBILDUNGSFÄHIGKEIT DER HUNDEMILZ IN VIVO.

VON

YUTAKA KOMORI, CHUJI IWAO UND HIDEO NAKAMURA.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik von
Prof. Dr. S. Tsunoo, Nagasaki.)

(Eingegangen am 23. Juni 1928).

In einer früheren Mitteilung konnten Komori und Iwao (1927), den Ergebnissen von Ernst und Szappanyos (1925) ganz entsprechend, die Bilirubinbildungsfähigkeit der überlebenden normalen Hundemilz durch Durchströmungsversuche bestätigen. Die vorliegende Arbeit bezweckt nun nachzuweisen, ob die Hundemilz auch *in vivo* die Fähigkeit habe, den Gallenfarbstoff zu bilden. Solche Versuchsanordnung schliesst nicht die Mitwirkung anderer Organe aus, wie schon Komori und Iwao betont haben. Wenn man aber in der Milzvene immer mehr Bilirubin nachweisen könnte, als in der entsprechenden Arterie, so dürfte man doch eine ausschlaggebende Beteiligung der Milz an der Bilirubinbildung annehmen, sei es, dass die vorbereitenden Prozesse in den anderen Organen vonstatten geben, sei es, dass die Prozesse der Bilirubinbildung in der Milz allein stattfinden. Dazu kommt noch ein grosser Vorteil, dass nämlich die Bakterienwirkung, die von einigen Autoren gegen die Arbeit von Ernst und Szappanyos geltend gemacht wurde, wenn auch dieser Einwand von Komori und Iwao schon unwahrscheinlich gemacht wurde, hier nicht in Frage kommen kann.

Wie Hijmans van den Bergh (1918) gezeigt hat, enthält das Hundeserum bei normalen Individuen kein Bilirubin oder nur Spuren desselben. Wenn man also die Bilirubinbildungsfähigkeit der Milz aus dem Unterschied des Bilirubingehaltes in der Milzvene und in der Milzarterie erschliessen will und dabei nicht auf spektrophotometrischen Wege, wie er von Mann und seinen

Mitarbeitern (1925) eingeschlagen wurde, sondern mit der Diazoreaktion vorgehen will muss man bei Hunden künstlich eine Hyperbilirubinämie hervorrufen. Dem Zweck unserer Untersuchung entsprechend darf die Hyperbilirubinämie aber nicht mechanisch durch Verhinderung des Gallenabflusses herbeigeführt werden, sondern muss durch übermässige Zufuhr von Gallenfarbstoffmaterial hervorgerufen werden, die zur Steigerung der extrahepatischen Bilirubinbildung führen müsste, wenn letztere überhaupt angenommen werden darf. Die übermässige Materialzufuhr geschah bei unseren Untersuchungen durch intravitale Hämolyse. Zur Herbeiführung derselben wurde die intravenöse Injektion von destilliertem Wasser anderen chemischen Blutgiften, wie Toluylendiamin und hämolytischen Sera, vorgezogen, erstens, weil der hämolysierende Mechanismus des Wassers im Gegensatz zu anderen Blutgiften festzustehen scheint, zweitens, weil bekannt ist, dass die Injektion von destilliertem Wasser nicht so schwere Leberveränderungen im Gefolge hat wie Toluylendiamin und ähnliche Gifte (Carazza, 1911) bzw. hämolytische Sera (Muggia, 1924).

Alle Versuche wurden an gesunden Hunden ausgeführt. Nachdem ihnen Morphium injiziert war, wurden sie in der Rückenlage fixiert. Nach Enthaarung mit Bariumsulfid und Desinfektion des Operationsherdes wurde der Bauch in der Medianlinie geöffnet. 10 ccm Blut wurden zur Kontrolle der Vena lienalis entnommen. Nach Blutstillung durch digitale Kompression wurde der Bauch wieder geschlossen.

Nun wurden der Angabe von Rich folgend (1922) 30 ccm steriles, destilliertes, auf 37°C erwärmtes Wasser pro Kilogramm Körpergewicht des Tieres innerhalb von fünf bis acht Minuten in die Vena jugularis injiziert. Der Bauch wurde zu verschiedenen Zeiten nach Vollzug der Wasserinjektion wieder geöffnet. Das Blut wurde fast gleichzeitig der Milzvene und -arterie entnommen und zentrifugiert. Das getrennte Serum wurde mit der vierfachen Menge 96% igen Alkohols versetzt und wieder zentrifugiert. Die quantitative und qualitative Bilirubinbestimmung wurde dann

am Zentrifugat ganz auf dieselbe Weise wie bei der früheren Arbeit angestellt. Neben der Bilirubinbestimmung wurde auch die Menge des Hämoglobins, das durch intravitale Hämolyse im Serum enthalten ist, nach Fleischl-Miescher bestimmt.

Die Versuchsergebnisse wurden zur Übersicht in einer Tabelle zusammengestellt. Daraus ergibt sich, dass in allen Versuchen mit Ausnahme eines einzigen Falles die Bilirubinreaktion, die im Kontrollversuch negativ ausfiel, 0,5–3 Stunden nach der Wasserinjektion positiv wurde. Dabei war die Reaktion am Blut der Milzvene ausnahmslos stärker als an dem der entsprechenden Arterie. Aber in quantitativer Hinsicht war die Farbenintensität mit Ausnahme von zwei Versuchen so schwach, dass man mit dem von Hellige hergestellten Vergleichskeil keine sichere Bestimmung anstellen konnte. In solchen Fällen beschränkten wir uns darauf, nur anzugeben, in welchem Gefässe, nach der Farbenintensität beurteilt, der Bilirubingehalt grösser war. In den zwei Versuchen, bei denen die quantitative Bestimmung ausgeführt werden konnte, enthielt das Milzvenenblut ziemlich viel Bilirubin, während in dem Arterienblut nur Spuren desselben gefunden wurden.

In der varigen Arbeit haben Komori und Iwao (1927) gefunden, dass der Gehalt der Durchströmungsflüssigkeit an freiem Hämoglobin nach der Durchströmung erheblich zunahm. Nun wurde bei den meisten hier vorliegenden Untersuchungen nachgewiesen, dass auch bei der intravitale Hämolyse der Gehalt des Serums an freiem Hämoglobin in der Milzvene mehr oder weniger grösser war, als in der Arterie. In welchem Zusammenhang mit der Blutmauserung diese Beobachtungen stehen, muss aber späteren Untersuchungen vorbehalten werden.

Was nun die Bilirubinbildungsfähigkeit der Milz bei der intravitale Hämolyse betrifft, so stehen unsere Ergebnisse im schroffem Gegensatz zu denen von Arnold Rice Rich (1922). Von ihm wurden nur Versuche angestellt, bei welchen immer mehrere Stunden nach der Injektion von 30 ccm Wasser pro Kilogramm Körpergewicht das Blut der Milzvene, der Arteria carotis

Versuchsnummer.	Datum.	Gewicht des Hundes. kg.	Menge des injizierten Wassers. ccm.	Zeitintervall zwischen der Wasserinjektion und der Röntgenaufnahme Std.	Vor der Injektion. V. lienalis.	Nach der Injektion	Vor der Injektion. V. lienalis.	Nach der Injektion (g/dl)	Hämoglobingehalt des Bluteserums. (nach Fleischl-Miescher)
1	1926 22. XI.	9.4	280	$\frac{1}{2}$	Diazo- reaktion (-)	Diazo- reaktion. V. lienalis. > A. lienalis.			
2	24. XI.	9.2	276	1	(-)	V. lienalis (spur) > A. lienalis (negativ)	0	0.280	0.304
3	1. XII.	6.95	210	1	(-)	V. lienalis. > A. lienalis.	0	0.176	0.208
4	13. XII.	9.0	270	2	(-)	V. lienalis (1.56 mg/dl) > A. lienalis (spur)			
5	24. XII.	4.5	135	2	(-)	V. lienalis. > A. lienalis	0	0.467	0.599
6	1927 6. I.	8.0	240	2	(-)	V. lienalis. > A. lienalis	0	0.128	0.136
7	7. I.	9.1	275	2	(-)	V. lienalis. > A. lienalis.	0	0.240	0.280
8	2. II.	5.9	177	2	(-)	V. lienalis. > A. lienalis.	0	0.371	0.383
9	1926 22. XII.	8.5	255	3	(-)	V. lienalis (1.38 mg/dl) > A. lienalis (spur)	0	0.767	0.863
10	1927 14. IV.	11.0	330	2	(-)	V. lienalis. > A. lienalis.	0	0.479	0.503
11	16. IV.	5.5	165	3	(-)	V. lienalis. > A. lienalis.	0	0.599	0.551
12	21. IV.	9.0	240	1 $\frac{1}{2}$	(-)	V. lienalis (-) A. lienalis (-)	0	1.413	1.581
13	7. V.	8.3	249	1 $\frac{1}{2}$	(-)	V. lienalis. > A. lienalis.	0.192	0.478	0.478
14	19. V.	8.2	246	1 $\frac{1}{2}$	(-)	V. lienalis. > A. lienalis.	0	0.255	0.295

und der Vena jugularis entnommen und untereinander in bezug auf den Bilirubingehalt verglichen wurden. Bei drei Versuchen, bei denen sich Bilirubin in beträchtlicher Menge überall im Serum fand, konnte gar kein Unterschied nachgewiesen werden. Bei dem vierten Versuch, bei dem das Milzvenenblut nur schwer gewonnen wurde, und Milzstauung die so leicht bei längerem Arbeiten an der Milzvene eintritt, zu konstatieren war, ergab die Analyse des Milzvenenblutes einen Wert von 1:240000, während das zur gleichen Zeit aus der Vena jugularis und Arteria carotis gewonnene Serum nur 1:280000 ergab. Seiner Meinung nach kann dieser einzige Versuch schwerlich für die Bedeutung der Milz als spezifisch bilirubinbildenden Organs sprechen. Woher kommt eine solche Diskrepanz zwischen seinen und unseren Ergebnissen?

Nach seinen Angaben geschah bei Rich der Vergleich immer mehrere Stunden nach der Injektion von Wasser. Vielleicht liegt ein Grund in diesen zeitlichen Verhältnissen. Er gibt auch an, dass sich Bilirubin "in beträchtlicher Menge" überall im Serum fand. Diese "beträchtliche Menge" könnte eine etwaige Differenz verdecken, die nach unseren Untersuchungen in den meisten Fällen nie gross ist. Man könnte gegen unsere Versuche einwenden, dass bei der Blutentnahme aus der Milzarterie und -vene leicht eine Milzstauung vonstatten ginge, die in der Folge einen grösseren Bilirubingehalt im Milzvenenblut hervorriefe. Bei unseren Versuchen aber war die gleichzeitige Entnahme aus der Milzarterie und -vene gar nicht schwer, sodass von Milzstauung gar keine Rede sein konnte. Auch angenommen, dass Milzstauung wirklich vorläge, kann man doch die grosse Differenz in den Versuchen 4 und 9 nicht verstehen, ohne dass die Bilirubinbildung in der Milz angenommen wird.

Wie grossen Anteil die Milz an der Bilirubinbildung bei der durch intravenöse Wasserinjektion hervorgerufenen, intravitalen Hämolyse hat, ist auch eine wichtige Frage. Rich fand, dass die splenektomierten Gallenfistelhunde unter den gleichen Bedingungen der Hämolyse genau so vielmal mehr ihres Normalwertes

an Bilirubin ausscheiden wie die normalen Gallenfistelhunde. Auch Sugiu und Ozu (1927) kamen vor kurzem zu demselben Resultat. Diese Beobachtungen scheinen der Milz eine spezifische oder beherrschende Rolle bei der Bildung von Bilirubin bei der intravitalen Hämolyse abzusprechen. Wir selbst können vorläufig zu dieser Frage keine Stellung nehmen, weil der Zweck unserer Arbeit nicht in der Feststellung liegt, wie viel Bilirubin die Milz bilden könne, sondern nur darin, ob die Milz auch bei der intravitalen Hämolyse Bilirubin zu bilden vermöge.

Zusammenfassend muss hier behauptet werden, dass die Milz auch in vivo bei der intravitalen Hämolyse, die durch die intravenöse Injektion vom destillierten Wasser hervorgerufen wird, Bilirubinbildungsfähigkeit entfalten kann.

LITERATUR.

- Komori, Y. und Iwao, C. (1927), Journ. of Biochem., **8**. 195.
Ernst, Z. und Szappanyos, B. (1925), Biochem. Zeitschr., **157**. 16.
Van den Bergh (1918), Der Gallenfarbstoff im Blute, Leiden.
Mann, Sheard, Bollmann und Baldes (1925), Americ. Journ. of Physiol., **74**. 497.
Carazza (1911), Gli Itteri Emolitici, Bologna. Zit. nach Rich.
Muggia, A. (1924), Folia med., **10**. 201. Zit nach Kongrzbld. f. inn. M. 1924, **34**. 464.
Rich, A. R. (1922), Kl. W., 2079.
Sugiu, K. und Ozu, H. (1927), Okayama-Igakkaï-Zasshi, **39**. 1902.

STUDIES IN EXPERIMENTAL SCURVY.

II. The carbohydrate metabolism of the animal fed on a vitamin C free diet.

By

TAKEYOSHI NAGAYAMA, HIKOSABURO MACHIDA
AND YOSHIO TAKEDA.

*(From the Laboratory of Biological Chemistry of the Tokyo Jikei-Kwai
Medical College, Tokyo.)*

(Received for publication, July 24, 1928.)

Collazo (1922) has published a paper on the blood sugar content of guinea pigs suffering from scurvy and later Palladin (1924) reported on the same problem. The former has performed a series of experiment with four guinea pigs. According to his investigation, the first guinea pig began to show hyperglycemia in a week after the symptoms of scurvy had been developed, and gradually the blood sugar content increased until the time of its death. This animal lived only nineteen days. The second lived thirteen days, and showed hypoglycemia throughout his whole life. In the case of the third, that lived thirty eight days, at first the blood sugar content fell for three or four days, then it increased gradually until it reached the maximum value on the thirty fifth day, and then it decreased again to normal before death. The fourth lived 33 days, and at first it showed hypoglycemia in a slight degree, but from the 15th day it began increasing, till on 31st day it reached the maximum value. According to Palladin's investigation, the blood sugar content begins to increase as soon as the food is changed to a diet free of vitamin C, and after the end of two weeks it reaches the maximum value. Then it goes down gradually until the animal dies. On the other hand, he has proved that the glycogen content of the liver gradually decreases in a scorbutic guinea pig till the amount can not be detected. Because of these results, he has concluded that there

is a disturbance of carbohydrate metabolism in the scorbutic animal. But the basal diet which was used by him consisted exclusively of "Hafer" and water recommended by Holst and Frölich (1907, 1912, 1913). McCollum, Simmonds and Pitz (1917) have already pointed out the incompleteness of the oat kernel, because it is not only deficient in amino-acids and salts, but also because it contains vitamin A in a very small amount. One of the authors (1918) of this paper has proved the existence of vitamin B in oatmeal. Nagayama (1918) had also shown that guinea pigs nourished with oats and cabbage do not grow up normally. We have to take great care as to the basal diet in this kind of experiment. Of course, it is the same thing also in the case of experimental scurvy. A series of experiment were performed in our laboratory with especial reference to this point.

EXPERIMENTAL METHOD.

Guinea pigs weighing 300–500 gm. were used. The basal diet, reported by Sherman (1922) and applied in our experiments was as follows:

Oatmeal	59%
Skimmed milk powder, heated on open trays at 110°, until all the antiscorbutic vitamin is destroyed.	30%
Butter fat, freshly prepared.	10%
Sodium Chloride.	1%

In addition to this basal diet, "daikon" (*Raphanus Sativus*) was given to the control animal as a vitamin C supply. Also the water was given ad libitum. All the experimental animals were bred in metallic cages. The body of the cage was made of wire-gauze and the bottom was covered doubly. A loose net was put on the upper part in order to prevent the accumulation of faeces. The lower part was a close meshed net and an enamel funnel was set under the bottom of it for the purpose of gathering the urine in a bottle. In the morning, before giving the food, the blood

TABLE I. (a)
Blood sugar content of guinea pigs fed on scorbutic diet.

Date.	No.	3	4	5	6	8	9	10
10/VII					0.132			0.122
17	0.105		0.117	0.130				—
26	—	0.133	0.108	0.134	0.0963			0.090
30	0.103 _w	0.134 _w	0.111 _w	0.135 _w	0.110 _w			0.112
3/VIII	0.106	0.133	0.101	0.133	0.122			—
6	0.115	0.134	0.113	0.135	0.102	0.132		0.117
10	0.147 _s	s	—	0.140	0.110	0.123		—
13			s	0.141	0.122	0.134		0.131
17				0.140 _d	0.127 _s	0.109		0.129
20				—		—		0.117
25				0.144		0.109		0.117
30				—		0.114 _w		0.134
4/IX				0.142		0.134		0.106
9				0.124		—		0.099
14				0.125		0.131		0.099
19				0.124		0.145		0.132
22				0.143		s		0.08 _w
26				0.130				0.115
30				—				0.116
5/X				0.135				0.157 _s
9				0.132				
13				0.117				
17				0.124				
21				0.115				
23				0.130				

W—"daikon" was omitted from the diet.

S—Died.

D—"daikon" was added.

TABLE I. (b)

No.	11	12	13	14	15	18	25	26	27	28	29
Date.											
9/IX	0.096	0.082									
14	—	0.102									
19	0.105	0.102									
22	0.095 _w	0.081 _w									
26	0.102	0.100									
30	0.108	0.098									
5/X	0.105	0.106	0.098	0.080	0.101						
9	0.124	—	—	0.099	0.103 _w						
13	0.127*	0.102*	0.099	0.095	0.104	0.101					
17			0.101	0.100	0.102	0.098					
21			0.102 _w	0.099 _w	0.100	0.099 _w					
23			—	—	—	—	0.109	0.101	0.115	0.096	0.115
25			0.110	0.099	0.113	0.109	0.098 _w	0.112 _w	— _w	0.100 _w	0.108 _w
27			—	—	0.110	—	—	—	—	—	—
30			0.087	0.095	*	0.098	0.097	0.097	0.116	0.097	0.091
3/XI			0.104	s		0.130	0.102	0.121	—	—	—
5			—			—	—	—	0.123	0.110	0.121
6			—			0.127	0.095	0.110	—	—	—
9			0.086			0.129	—	—	—	—	—
11			s			*	0.108	0.081 _s	0.118	0.090	0.092 _s
14							0.107		—	— _π	
16							0.114 _s		s		

*—Beat to death.

sugar content was determined by Bang's (1922) new method. The glycogen content of the control and the scorbutic animal were estimated by Pflüger-Imamura's (1921) method. In the case of the scorbutic, it was determined on the first, second and third week.

Experimental results.

The experimental results will be described as follows.

A. BLOOD SUGAR CONTENT OF GUINEA PIGS.*1. The case of normal guinea pigs.*

According to the results obtained by 66 determinations with eighteen normal guinea pigs, the blood sugar content of the normal was 0.08–0.135%, average 0.109%. The majority of the blood sugar contents was almost the same as the mean value while only four guinea pigs had ca. 0.130%.

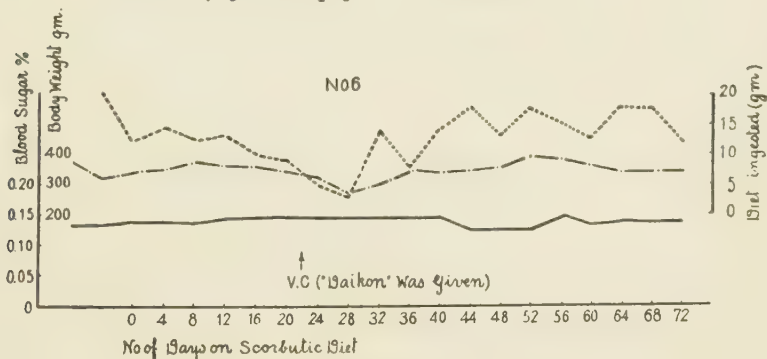
2. The case of guinea pigs on scorbutic diet.

Fig. 1.

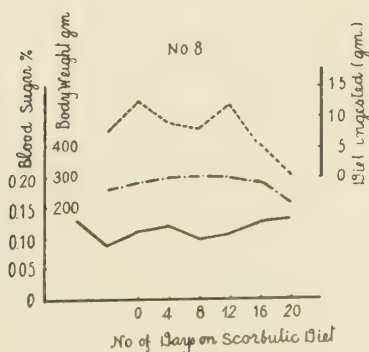


Fig. 2.

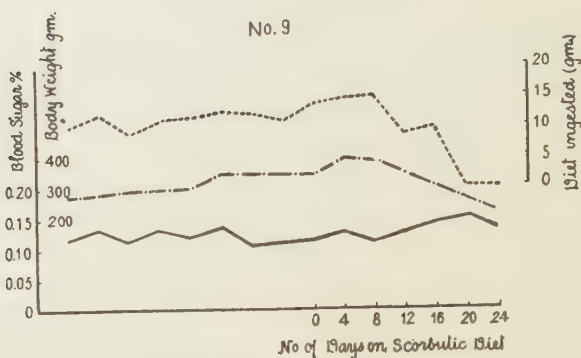


Fig. 3.

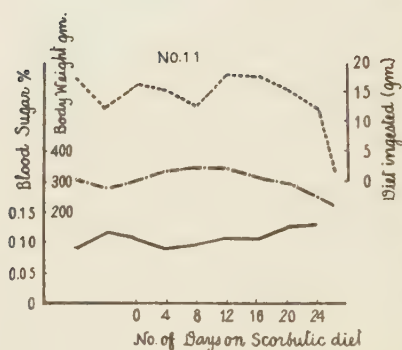


Fig. 4.

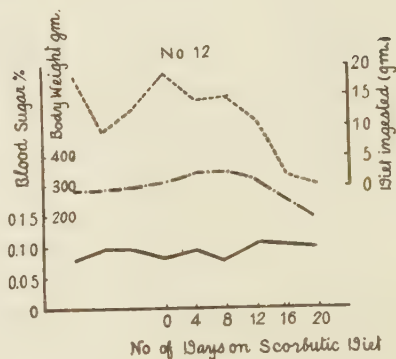


Fig. 5.

- indicates the percentage of blood sugar.
 indicates the amount of diet ingested by guinea pig.
 ----- indicates the body weight.

The result of the experiment, performed with seventeen guinea pigs with 64 determinations, showed an average of 0.111% (Table I. a, b.)

The body weight, appetite and blood sugar content of some scorbutic animals are shown in the above figures 1, 2, 3, 4 and 5.

B. THE LIVER GLYCOGEN CONTENT.

1. *The case of guinea pigs, fed with vitamin C free diet for a week.*

The determination for the liver glycogen was performed as soon as the animal was beaten to death. The results are shown in table II.

TABLE II.

Number of animals	Initial body weight gm	Final body weight gm	Percent age of decrease in body weight %	Weight of liver gm	Amount of gly-cogen %	Autopsy findings
30	474	450	- 5	10.8	0.21	Scurvy not developed
31	402	360	-10	9.9	0.26	
32	425	320	-24	9.4	0.20	
Average					0.223	
Control	454	405	-10	13.5	0.88	

2. *The case of guinea pigs, fed with vitamin C free diet for two weeks.*

The results are shown in table III.

TABLE III.

Number of animals	Initial body weight gm	Final body weight gm	Percent- age of decrease in body weight %	Weight of liver gm	Amount of gly-cogen %	Autopsy finding
33	452	370	-18	14.3	1.81	Developed scurvy
34	410	355	-13	13.0	1.85	
35	452	355	-21	5.8	1.72	
Average					1.79	
Control					1.72	

3. *The case of guinea pigs, fed with a diet free from vitamin C for three weeks.*

The results are shown in table IV.

TABLE IV.

Number of animals	Initial body weight	Final body weight	Percent- age of decrease in body weight	Weight of liver	Amount of gly- cogen	Autopsy findings
	gm	gm	%	gm	%	
36	480	352	-32	8.6	0.42	Scurvy well developed
37	500	330	-34	10.25	0.25	
38	426	404	-29	12.9	0.50	
39	520	370	-29	11.1	0.23	
40	525	335	-36	11.9	0.18	

The liver glycogen content of guinea pigs, starved for during three days, is shown in table V.

TABLE V.

Number of animals	Initial body weight	Final body weight	Percentage of decrease in body weight	Weight of liver	Amount of glycogen
	gm	gm	%	gm	%
41	360	315	-12	10.4	0.26
42	318	262	-17	9.1	0.14
43	610	495	-19	14.51	0.17
44	660	520	-21	17.52	0.09
45	510	390	-23.5	10.03	0.12

DISCUSSION.

The experiments above-mentioned suggest to us that the blood sugar content in scorbutic guinea pigs is not so different from that

of normal ones, which is contrary to what Palladin reported. But some of them suddenly showed a tendency to hyperglycemia right before death.

Although the weight of our guinea-pigs was lighter and their life was shorter than those of Palladin's case, our animals never belong to Palladin's so called poor guinea-pigs, in which both the body weight and the blood sugar content decrease, as in our experiments the body weight of the animal used always increased at first and decreased only gradually until the death sets in, without accompanying any decrease in blood sugar content. The increase of blood sugar, which sometimes appears suddenly before the death of the animals, does not seem to be due to mere scurvy, as we always find the same phenomenon occurring in guinea-pigs which die from other causes than scurvy.

The liver glycogen content of the scorbutic animal in the first week, in the second week, and in the third week was 0.223%, 1.79%, and 0.316% respectively. A slightly low content of liver glycogen in the first week might not be due to diet void of Vitamin C but it is probably due to inanition on account of unfamiliar food. Because even in the control animal which had a poor appetite the first week, the amount of glycogen content in the liver decreased in that period, namely 0.88% and the amount increased in the second week as soon as the appetite of the animal became better. But in the third week the amount decreased again, accompanying a loss of appetite. Therefore, we cannot conclude that the decrease of the liver glycogen content at the end of the experimental scurvy is due to the lack of vitamin C, unless we could exclude the accompanying starvation. Those to which vitamin C was not given betrayed the symptoms of scurvy from the end of the second week and yet the amount of the glycogen content in this time was not different from that of the normal. Moreover, in the result that we determined after killing an animal on the verge of death but not afflicted with the scurvy, the glycogen was greatly reduced. We could not find any different condition in the case of those on

vitamin C free diet. Therefore, we cannot assert that the disturbance of glycogen formation in the liver comes only from a vitamin C free diet. From the above-mentioned experiment, we cannot say that a vitamin C free diet gives rise to a remarkable disturbance of carbohydrate metabolism in guinea pigs.

CONCLUSION.

1. The blood sugar content of a normal guinea pig was 0.109% on the average.

2. No remarkable change was seen in the blood sugar content of guinea pigs fed on a vitamin C free diet, but there were some that showed an increase in blood sugar content right before death.

3. It is still doubtful whether the tolerable decrease of the liver glycogen content at the end of scurvy is due to inanition or to the vitamin C deficiency.

4. In the experimental scurvy, there was no remarkable disturbance in the carbohydrate metabolism.

REFERENCES.

- Bang, I. (1922): Mikromethode zur Blutuntersuchung. 3. Aufl.
Collazo, J. A. (1922): Biochem. Z. 134.
Holst, A. und Frölich, T. (1907, 1912, 1913): Z. f. Hygiene und Infektionskrankheiten.
Imamura, A. (1921): Mitteil. d. med. Fakul. d. Keiserl. Univers. zu Tokyo. XXVIII. Heft, I.
McCollum, E. V., Simmonds, N. and Pitz, W. (1917): J. Biol. Chem. 29.
Nagayama, T. (1918): Sei-IKwai Med. J. No. 446.
Palladin, A. (1924): Biochem. Z. 152.
Sherman, H. C. (1922): Sherman and Smith, The vitamins.

Additional writing:

The subsidy for natural science in the Educational Department was applied to expense of this study.

STUDIES IN EXPERIMENTAL SCURVY.

III. The nitrogen metabolism of the animal fed on a vitamin C free diet.

BY

TAKEYOSHI NAGAYAMA AND NOBORU SATO.

(From the Laboratory of Biological Chemistry of the Tokyo Jikei-Kwai Medical College, Tokyo.)

(Received for publication, July 24, 1928.)

In a previous paper, Nagayama, Machida and Takeda (1928) reported on the carbohydrate metabolism in experimental scurvy. Now, in this paper we announce the results of an investigation on nitrogen metabolism in such a case. Also on this problem, Palladin (1924) reported some important results which are as follows: 1. Increase of ammonia in the urine according to the progress of the scurvy. 2. Increase of the creatine amount in the urine and of the creatinine coefficient. 3. Increase of the creatine in the muscle contemporaneous with these phenomena. From these results, he concluded that the lack of vitamin C brings about a disturbance in creatine metabolism and this causes an increase in the creatine of muscle and the creatine in urine, and also that the disturbance of creatine metabolism probably comes from the disturbance of carbohydrate metabolism in the animal, fed with a vitamin C free diet. Besides, viewed from the creatine metabolism in experimental scurvy, he said that these facts gave a new proof to the endogenous origin of creatinine and of creatine in urine. Nevertheless, as a basal diet, he used only oats and water which Holst and Frölich (1907, 1912, 1913) employed the first time. Consequently, it is a natural thing that it was incomplete in the point of nutrition without regard to the lack of vitamin C as previously stated. We investigated the nitrogen metabolism, especially the creatine metabolism of the guinea pig

fed with Sherman's (1922) perfect diet except that there was a lack of vitamin C in order to know whether our cases agreed with Palladin's or not.

I. THE AMOUNT OF NITROGENOUS CONSTITUENT IN THE URINE OF
THE EXPERIMENTAL SCORBUTIC GUINEA-PIG.

A. *The method of the experiment.*

As the experimental animal, a guinea pig weighing about 500 gm. was used. The cage and diet are the same as those reported in the previous paper.

After collecting urine for two days in a bottle to which toluene was added, we determined the total nitrogen by Kjeldahl's method, the urea by Marshall's urease method (1913), the uric acid by Benedict and Franke's method (1922), the creatine and creatinine by Folin's colorimetric method (1914), and the ammonia by Folin's method. But in the case of the urea and ammonia there were some remarkable errors caused by fermentation. Accordingly, we gave up the determination of these constituents and measured only the ammonia in the urine which was directly taken from the bladders of some scorbutic guinea pigs.

B. *The result of the experiment.*

In the experiments with six guinea pigs by the above-mentioned method, various kinds of nitrogen such as the total nitrogen in the urine for two days, the nitrogen per kilo of the body weight, creatine nitrogen, and creatinine nitrogen were determined and, secondly, the percentage of the latter two nitrogens to the whole nitrogen was figured as the following results show. However, each average in each week of the scorbutic period was compared with the control in which "daikon" (*Raphanus Stativus*) was added to the standard vitamin C free diet.

These results are shown in Tables I, II, III, IV, V, VI, and VII.

The average of the creatinine coefficient in the scorbutic period for each guinea pig is shown in Fig. 1 as a curve.

TABLE I.
The Contents in the urine for 2 days.

Date	Body weight	Total N.	Total N. per 1 kilo body weight	Creatinine N.	Creatinine N. gm.	Creatinine N. %	Creatinine N. to total N. +	Creatinine N. coefficient	Uric acid N. gm.	Uric acid N. %	Remarks
17/IX	525	0.445	847	0.0047	0.00107	1.23	5.2	5.2	0.0012	0.270	Fed with basal diet and "daikon" (Control)
19/IX	520	0.451	867	0.0071	0.00187	1.97	8.6	8.6	0.0019	0.420	
21/IX	510	0.493	965	0.0089	—	—	—	—	0.0018	0.365	
23/IX	515	0.426	830	0.0092	0.00163	2.54	10.5	10.5	0.0015	0.352	
25/IX	500	0.443	892	0.0087	0.00167	2.62	10.4	10.4	0.0013	0.292	
Average		0.452	880	0.0077	0.00156	2.09	8.7	8.7	0.00154	0.340	
29/IX	490	0.382	780	0.0085	0.0022	3.16	10.9	10.9	0.0013	0.340	Fed with basal diet and water. (Scorbutic) died on 9/X.
1/X	470	0.452	960	0.0095	0.0030	2.76	13.3	13.3	0.0010	0.221	
3/X	455	0.398	875	0.0063	0.0054	2.94	12.8	12.8	0.0008	0.201	
5/X	440	0.455	1030	0.0062	0.0056	2.60	13.4	13.4	0.0011	0.242	
Average		0.421	912	0.0076	0.00405	2.86	12.6	12.6	0.00105	0.306	
7/X	405	0.675	1670	0.0082	0.0137	3.24	27.0	27.0	0.0017	0.252	
9/X	340	0.724	2120	0.0047	0.0194	3.32	35.4	35.4	0.0011	0.152	
Average		0.699	1895	0.0065	0.0166	3.28	31.2	31.2	0.0014	0.202	

TABLE II.
The Contents in the urine for 2 days.

Date	Body weight gm.	Total N. gm.	Total N. per 1 kilo body weight	Creatinine N. gm.	Creatine N. gm.	Creatine N. + creatinine N. to total N. %	Creatinine coefficient	Uric acid N. gm.	Uric acid N. to total N. %	Remarks
17/IX	550	0.446	840	0.0090	0.0015	2.66	9.5	0.0010	0.224	Fed with basal diet and "daikon" (control)
19/IX	550	0.513	935	0.0100	0.0021	2.36	11.0	0.0016	0.312	
21/IX	535	0.290	542	0.0054	0.0015	2.65	6.5	0.0016	0.489	
23/IX	560	0.461	823	0.0080	0.0032	2.38	10.0	0.0014	0.304	
25/IX	545	0.351	644	0.0072	0.0018	2.56	3.3	0.0018	0.513	
Average		0.412	750	0.0079	0.0020	2.52	9.1	0.0015	0.369	
29/IX	555	0.322	580	0.0074	0.0009	2.58	7.5	0.0014	0.435	Fed with basal diet and water (scorbutic) Autopsy finding showed scorbutic changes.
1/X	540	0.321	595	0.0060	0.0015	2.34	6.9	0.0008	0.249	
2/X	525	0.375	715	0.0062	0.0038	2.66	9.5	0.0009	0.240	
5/X	520	0.449	865	0.0069	0.0038	2.38	10.3	0.0012	0.268	
Average		0.366	690	0.0066	0.0025	2.49	9.6	0.00107	0.298	
7/X	495	0.587	1190	0.0104	0.0033	2.34	13.8	0.0017	0.290	
9/X	485	0.587	1210	0.0069	0.0082	2.57	13.8	0.0012	0.204	
11/X	445	0.560	1260	0.0061	0.0118	3.20	20.1	0.0015	0.268	
13/X	410	0.501	1220	0.0035	0.0124	3.17	19.4	0.0005	0.100	
Average		0.559	1220	0.0067	0.0089	2.82	16.8	0.0012	0.216	

TABLE III.
The Contents in the urine for 2 days.

Date	Body weight	Total N.	Total N. per 1 kilo body weight	Creatinine N.	Creatine N.	Creatinine N. + creatinine N. to total N.	Creatinine coefficient	Uric acid N.	Uric acid N. to total N.	Remarks
	gm.	gm.	mg.	gm.	gm.	%		gm.	%	
11/IX	510	0.673	1320	0.0085	0.0037	1.81	11.9	0.0022	0.327	Fed with basal diet and "daikon" (control)
13/IX	515	0.386	750	—	—	—	—	—	—	
15/IX	520	0.288	553	0.0074	0.0017	2.62	8.8	—	—	
17/IX	535	0.880	1640	0.0101	0.0018	1.33	11.1	0.0032	0.364	
19/IX	520	0.505	970	0.0065	0.0042	2.12	10.3	0.0025	0.495	
21/IX	520	0.522	1006	0.0089	0.0025	2.18	11.0	0.0028	0.535	
23/IX	505	0.414	820	0.0056	0.0019	1.81	7.4	0.0014	0.315	
25/IX	510	0.468	917	0.0075	0.0027	2.46	10.0	0.0011	0.236	
Average		0.517	895	0.0078	0.0026	2.04	10.1	0.0022	0.389	
29/IX	495	0.254	513	0.0051	0.0016	2.64	6.8	0.0011	0.433	Fed with basal diet and water (sorbitic)
1/X	510	0.515	1010	0.0102	0.0029	2.54	12.8	0.0015	0.291	
3/X	510	0.542	1060	0.0081	0.0048	2.38	12.6	0.0019	0.350	
5/X	510	0.441	865	0.0039	0.0034	2.33	8.9	0.0012	0.272	
Average		0.437	860	0.0076	0.0032	2.47	10.3	0.0014	0.336	
7/X	515	0.518	1005	0.0099	0.0036	2.60	13.1	0.0020	0.383	Autopsy finding showed ^a remarkable development of scurvy.
9/X	505	0.514	1015	0.0077	0.0067	2.80	14.3	0.0011	0.214	
11/X	460	0.441	960	0.0064	0.0063	2.87	13.8	0.0015	0.340	
13/X	430	0.382	890	0.0047	0.0082	3.28	15.0	0.0010	0.262	
15/X	395	0.628	1590	0.0070	0.0145	3.42	27.2	0.0021	0.334	
Average		0.495	1090	0.0072	0.0079	3.01	16.7	0.0015	0.308	

No. 4. **TABLE IV.**
The Contents in the urine for 2 days.

Date	Body weight	Total N.	Total N. per 1 kilo body weight	Creatinine N.	Creatinine N.	Creatinine N. + creatinine N. to total N.	Creatinine coefficient	Uric acid N.	Uric acid N. to total N.	Remarks
	gm.	gm.	mg.	gm.	gm.	%	—	gm.	%	
13/IX	500	0.260	520	—	—	—	—	—	—	Fed with scurbatic diet
15/IX	520	—	—	0.0072	0.0018	—	9.0	0.0013	—	from the
17/IX	520	0.355	683	0.0081	0.0004	2.4	8.2	0.0014	0.394	beginning of the
19/IX	510	0.445	872	0.0074	0.0042	2.6	10.7	0.0010	0.224	experiment, died on 3/X.
Average		0.353	693	0.0076	0.0021	2.5	9.2	0.0012	0.309	Autopsy finding: a remarkable development of senury.
21/IX	500	0.283	586	0.0052	0.0013	2.2	6.5	0.0008	0.273	
23/IX	515	—	—	—	—	—	—	—	—	
25/IX	485	0.299	615	0.0052	0.0050	3.4	10.5	0.0009	0.302	
Average		0.296	601	0.0052	0.0031	2.8	8.5	0.0008	0.288	
1/X	355	0.360	1410	0.0021	0.0130	4.2	21.2	0.0006	0.167	
3/X	310	0.542	1750	0.0033	0.0197	4.2	37.0	0.0004	0.074	
Average		0.333	1580	0.0027	0.0164	4.2	29.1	0.0005	0.121	

No. 5.
TABLE V.
The Contents in the urine for 2 days.

Date	Body weight	Total N.	Total N. per 1 kilo body weight	Creatinine N.	Creatinine N. gm.	Creatinine N. %	Creatinine N. + to total N.	Coefficient	Uric acid N. gm.	Uric acid N. % to total N.	Remarks
16/IX	540	0.476	880	0.0116	0.0003	2.50		11.0	0.0017	0.357	Fed with scurbutic diet from the beginning of the experiment, died on 7/X.
18/IX	530	0.353	675	0.0080	0.0003	2.32		7.8	0.0018	0.503	
20/IX	530	0.441	835	0.0074	0.0011	2.06		8.6	0.0017	0.386	
22/IX	540	0.531	985	0.0116	0.0025	2.36		13.0	0.0020	0.453	Autopsy finding: a remarkable development of scurvy.
Average		0.452	844	0.0097	0.0011	2.31		10.1	0.0018	0.429	
24/IX	540	0.585	1080	0.0094	0.0025	2.04		11.0	0.0012	0.205	
28/IX	505	0.333	650	0.0075	0.0032	3.22		10.6	0.0016	0.480	
Average		0.459	870	0.0085	0.0029	2.63		10.8	0.0014	0.343	
2/X	445	0.252	565	0.0037	0.0062	3.48		11.1	0.0009	0.202	
4/X	395	0.290	735	0.0037	0.0064	3.48		12.8	0.0005	0.127	
6/X	365	0.399	1090	0.0028	0.0116	3.86		21.0	0.0004	0.110	
Average		0.314	790	0.0028	0.0080	3.67		14.9	0.0007	0.146	

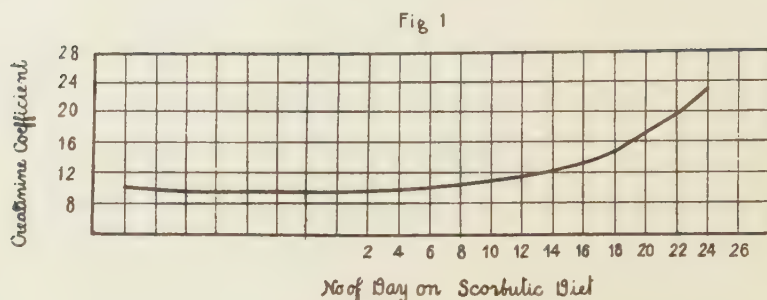
No. 5.
TABLE VI.
The Contents in the urine for 2 days.

Date	Body weight	Total N.	Total N. per 1 kilo body weight	Creatinine N.	Creatine N.	Creatinine N. + creatinine N. to total N.	Creatinine coefficient	Uric acid N.	Uric acid N. to total N.	Remarks
16/IX	gm. 490	gm. 0.322	mg. 675	gm. 0.0089	gm. 0.0004	% 3.82	8.4	gm. 0.0030	% 0.910	Fed with scurbutic diet from the beginning of the experiment, died on 6/X. Autopsy finding: a remarkable development of scurvy.
18/IX	490	0.379	770	0.0075	0.0009	2.22	8.6	0.0029	0.765	
20/IX	495	0.342	690	0.0061	0.0012	2.14	7.4	0.0015	0.440	
22/IX	510	0.307	602	0.0052	0.0006	1.91	5.7	0.0015	0.488	
Average		0.340	684	0.0069	0.0008	2.52	7.2	0.0022	0.651	
24/IX	500	0.456	910	0.0065	0.0012	1.69	7.7	0.0012	0.263	
28/IX	495	0.307	620	0.0074	0.0010	2.72	8.4	0.0010	0.326	
30/IX	495	0.277	560	0.0043	0.0025	2.45	5.8	0.0004	0.144	
Average		0.347	697	0.0061	0.0018	2.29	7.3	0.0008	0.244	
2/X	480	0.326	680	0.0059	0.0018	2.06	8.0	0.0007	0.214	
4/X	430	0.307	713	0.0038	0.0069	3.94	12.4	0.0006	0.196	
6/X	380	0.582	1530	0.0055	0.0124	3.07	23.6	0.0008	0.137	
Average		0.304	731	0.0051	0.0070	3.02	14.7	0.0006	0.182	

TABLE VII.

The Contents in the urine for 2 days.

Date	Body weight	Total N.	Creatinine N. + per 1 kilo body weight	Creatinine N.	Creatinine N. gm.	Creatinine N. + to total N.	Creatinine coefficient	Uric acid N.	Uric acid N. to total N.	Remarks
24/IX	gm. 450	gm. —	mg. —	gm. 0.0030	gm. 0.0032	% —	8.70	gm. 0.00084	% —	Fed with basal diet and "daikon" (control)
26/IX	450	0.100	222	0.0017	0.0009	2.66	2.94	0.00045	0.450	
Average		0.100	222	0.0024	0.00209	2.66	5.82	0.00065	0.450	
28/IX	450	0.159	354	0.0031	0.0006	2.32	4.11	0.0006	0.378	Fed with basal diet and water (scurbutic). died on 14/X.
2/X	415	0.143	344	0.0051	0.0008	1.62	8.10	0.0003	0.209	
4/X	400	0.126	315	0.0022	0.00126	2.74	4.32	0.0003	0.238	
6/X	375	0.153	407	0.0021	0.00168	2.47	5.04	0.0005	0.326	
Average		0.145	355	0.0022	0.00109	2.29	5.39	0.0004	0.288	Autopsy finding: scurbutic changes.
8/X	345	0.246	713	0.0030	0.0065	3.86	12.2	0.0003	0.122	
10/X	325	0.238	731	0.0017	0.0079	4.03	14.7	0.0002	0.094	
12/X	305	0.370	1222	0.0025	0.0089	3.99	18.7	0.0006	0.162	
14/X	275	0.381	1385	0.0027	0.0142	4.44	30.8	0.0006	0.158	
Average		0.309	1013	0.0025	0.0094	3.86	19.1	0.0004	0.132	



As seen in the above table, in the amount of the total nitrogen in the urine there was not so much variation, but there was some increase in the amount before death, so this phenomenon might be a so-called premortal increase. There was no variation in the creatinine nitrogen from the control period to the scorbutic, but when there was any variation, it mostly showed in a slight decrease in the amount of excretion. On the contrary, the amount of the creatine nitrogen increased with the progress of scurvy, especially, at the time of death it became quite remarkable. In consequence, the creatinine coefficient also rose at the same time. As for the uric acid there was more or less of a decrease in the amount of excretion toward the later period.

II. THE AMOUNT OF AMMONIA IN URINE.

We could not get ascertain exactly the amount of urea and ammonia in the urine which was taken using the animal's ordinary cage. In spite of the fact that the urine was taken directly in a vacuum flask into which ice was put, ammoniacal fermentation in some degree could not be avoided. As a last resort, we tied up the penis of the guinea pig and after twelve hours took the urine directly from the bladder and soon determined the ammonia in the fresh urine. The amounts of ammonia in this urine in the normal or scorbutic period are shown in table VIII.

TABLE VIII.

Number of guinea pigs	Scorbutic period (days)	Ammonia N (mg/dl)
Normal	—	9.8
No. 8	12	13
No. 9	14	14
No. 10	16	13
No. 11	19	19.5

In the scorbutic period the concentration of the ammonia in the urine was greater than that of the control; besides, it was likely to increase gradually with the progress of the disease. We, on the one hand, determined the amount of various nitrogenous substances in the fresh urine of the normal guinea pig and on the other hand determined the urine which was excreted naturally. The former was compared with the latter and the results are shown in table, IX.

TABLE IX.

Mg/dl of total creatinine, creatine and uric acid nitrogen in the urine of the normal guinea pig which was directly gathered from the bladder or naturally excreted.

(Number of guinea pig, 12.)

Mg/dl	*Bladder urine	Excreted urine
Total-N	722	1562
Urea-N	70.4	—
Uric acid N	9.64	5.78
Creatinine N	27.8	26.5
Creatine N	7.2	7.14
Ammonia N	9.8	—

* Penis was tied up for 12 hours.

According to this investigation, unlike the case of urea and ammonia, there was not a great difference between the amounts of uric acid nitrogen, creatinine nitrogen, and creatine nitrogen in the fresh urine and the urine which was naturally excreted. Therefore, also in the experiment of the urine which was taken in the animal's ordinary cage, the determination of those nitrogenous substances would be the same.

III. THE AMOUNT OF NITROGENOUS CONSTITUENTS IN THE URINE OF THE GUINEA PIG IN STARVATION.

At the end of experimental scurvy, most guinea pigs fall into a condition of complete inanition from the loss of appetite. Besides, before the time of death, the creatine in the urine increased remarkably. Consequently, it is needless to say that more experimenting ought to be done to ascertain the relation between starvation and the excretion of these nitrogenous constituents. For two days no food was given and the nitrogenous constituent in the urine was determined. The results are shown in Table X.

In the starvation experiment performed on four guinea pigs, they died from starvation in from three to six days. As in the case of the starvation of the other animals the total nitrogen in the urine increased remarkably before death. Creatinine nitrogen did not usually show any variation until the animal died, but sometimes it showed a tendency to decrease in some degree. On the contrary, as for the creatine nitrogenous excretion, the amount in the urine was always increased by fasting. Then the uric acid nitrogen in the urine gradually increased and the curve of the creatinine coefficient rose. It differs from the case of the scorbutic period, for the uric acid excretion increased in the starvation experiments.

IV. THE AMOUNT OF CREATINE IN MUSCLE.

In the above chapter, we described the amounts of creatine and creatinine in the urine of a scorbutic guinea pig. We also determined the amount of creatine in the muscle of the scorbutic

TABLE X.
The Contents in the urine for 2 days.

Date	Body weight	Total N.	Total N. per 1 kilo body weight	Creatinine N. gm.	Creatinine N. gm.	Creatinine N. gm.	Creatinine N. + to total N. %	Creatinine coefficient	Uric acid N. gm.	Uric acid N. % to total N.	Remarks
No. 13	12/X	gm. 480	gm. 1450	0.0096	0.0093	19.7	2.71	19.7	0.00158	0.226	Faster from the morning on 15/X, died on the night of 17/X.
	14/X	490	1135	0.0074	0.0086	16.3	2.88	16.3	0.00048	0.0862	
	17/X	415	2920	0.0105	0.0222	39.4	2.70	39.4	0.0024	0.280	
No. 14	12/X	520	510	0.0079	0.0067	14.0	5.50	14.0	0.00137	0.517	Fasted from 15/X, died on the night of 19/X.
	14/X	510	1140	0.0102	0.0069	16.7	2.94	16.7	0.00172	0.327	
	17/X	430	1300	0.0084	0.0145	26.6	4.10	26.6	0.00216	0.502	
	19/X	380	2500	0.0067	0.0199	35.0	2.80	35.0	0.00298	0.795	
No. 15	12/X	490	1015	0.00814	0.00316	11.5	2.28	11.5	0.00163	0.329	Fasted from 16/X, died on the morning of 23/X.
	18/X	405	1040	0.00538	0.0108	20.0	3.82	20.0	0.00260	0.642	
	20/X	350	1830	0.00710	0.0214	40.7	4.45	40.7	0.00246	0.284	
	22/X	330	2220	0.0043	0.0242	43.2	3.90	43.2	0.00082	0.101	
No. 16	13/X	490	976	0.00615	0.00296	9.27	1.90	9.27	0.00126	0.262	Fasted from 16/X, died on the night of 18/X.
	18/X	375	2240	0.00343	0.01830	26.80	2.39	26.80	0.00218	0.240	

guinea pig in each period. The method of the determination of creatine in the muscle was that (1924) which Palladin described.

1. *The amount of creatine in the muscle of the normal guinea pig.*

At first, as a control, the amount of the creatine in the muscle of a normal guinea pig was determined and compared with that of the six guinea pigs. The results are as shown in table XI.

TABLE XI.

Number of guinea pigs	Body weight gm.	Muscle creatine %
No. 17	453	0.443
18	475	0.410
19	445	0.417
20	485	0.405
21	460	0.435
22	460	0.465
Average		0.429

According to this investigation, the minimum is 0.405%, the maximum 0.465% and the average, 0.429%.

2. *The amount of creatine in the muscle of the experimental scorbutic guinea pig.*

The results in which the amounts of creatine in the muscle in various scorbutic periods were determined are shown in the table XII.

For the sake of convenience, we inserted in the table the average percentage of muscle creatine for successive days in the scorbutic period. On the average, it amounted 0.430% on the seventh day, 0.367% on the twelfth, 0.410% on the fourteenth, 0.371% from the sixteenth to the seventeenth, 0.439% from the nineteenth to the twentieth and 0.372% from the twenty-second to the twenty-eighth. In comparing these values with the amount in the normal guinea pig which was mentioned before, there was hardly any difference and in the scorbutic period the amount decreased in some degree.

TABLE XII.

Number of guinea pigs	Body weight		Scorbutic period	Muscle creatine	Autopsy findings
	Initial period	Final period			
	gm	gm	days	%	
No. 23	485	390	7	0.370	—
No. 24	474	450	7	0.428	—
No. 25	425	320	7	0.468	—
No. 26	535	440	7	0.455	—
Average				0.430	
No. 27	500	335	12	0.415	+
No. 28	410	305	12	0.318	+
Average				0.367	
No. 29	452	370	14	0.421	++
No. 30	410	355	14	0.433	++
No. 31	560	370	14	0.276	+
Average				0.410	
No. 32	565	410	16	0.400	+
No. 33	450	275	17	0.344	+++
No. 34	450	340	17	0.386	++
Average				0.371	
No. 35	520	370	19	0.480	+++
No. 36	525	335	20	0.398	+++
Average				0.439	
No. 37	555	330	22	0.310	+++
No. 38	480	325	22	0.371	+++
No. 39	500	295	24	0.430	+++
No. 40	530	335	28	0.375	+++
Average				0.372	

Foot Note: The severity of autopsy findings such as hemorrhages and fragility of bones and looseness of teeth are indicated by,— (no different from normal), and +, ++, +++ for increasing degrees of severity.

3. *The amount of creatine in the muscle of the guinea pig in starvation.*

Sometimes it happened that the amount of creatine in the muscle of the scorbutic guinea pig was little more than that of the normal. Accordingly, we determined the amount of the creatine in the muscle with some starved guinea pigs in order to know whether this phenomenon is connected with starvation, or not. The results are shown in table XIII.

TABLE XIII.

Number of guinea pigs	Body weight		Muscle creatine	Fasted
	Initial period	Final period		
	gm	gm	%	days
No. 19	560	375	0.372	3
17	595	380	0.360	5
18	530	330	0.393	7
Average			0.375	

In the above table, it is shown that the amount of creatine in the muscle of the starving guinea pig was small when compared with the value in that of the normal. The minimum was 0.360%, the maximum, 0.393%, and the average 0.375%.

V. DISCUSSION.

Keeping the basal diet (complete except for a deficiency in vitamin C) when we investigated nitrogen metabolism in the guinea pig's scurvy, especially creatine metabolism, we found no variation in the amount of creatinine nitrogen in the urine during the progress of scurvy, in fact it showed a tendency to decrease. On the contrary excretion of creatine nitrogen became quite abundant right before death. Consequently the creatinine coefficient also rose. Generally speaking, this fact agreed with the result of Palladin's experiment. While in the case of

the normal the amount of creatine in the muscle showed an average of 0.429%, in the guinea pig which developed scorbutic symptoms it amounted to 0.390% on the average. Therefore, it differs from Palladin's result for he found the amount of muscle creatine to decrease in the scorbutic period. On the other hand, in the determination of the amount of creatine in the muscle of the guinea pig in starvation, such results as a minimum of 0.360%, a maximum of 0.393% and an average 0.375% were given. Then in comparison with that of the normal, the value in this case was small. It has been known that scurvy brings a loss of appetite and leads to a condition of absolute or partial starvation. It is supposed that there may be some connection with the starvation which causes the creatine of muscle to decrease in the scorbutic period. The fact that the excretion of creatine and creatinine nitrogen in the urine took almost the same course in scurvy and in starvation, seems to indorse the previous opinion.

In the determination of the amount of ammonia in fresh urine, it showed a tendency to increase in the scorbutic period as in Palladin's experiment. As for uric acid nitrogen it showed no variation throughout, in fact, the amount began to decrease towards the end. But on the contrary, in the starvation experiment the amount of uric acid nitrogen increased as the hour of death drew near as in the case of all starving animals. This is the very point in which the nitrogen metabolism in scurvy differs from the metabolism in starvation. As regards this point, it is open to study. From the previous studies it is difficult to affirm about the disturbance of creatine metabolism in experimental scurvy and even if it can not be asserted that it is rather owing to starvation, at least in our cases, such a conclusion as the defect of vitamin C in diet bringing a disturbance in creatine metabolism, will not be given. The cause why creatine in the urine increases might be due to some other factor than starvation, which comes at the end of the disease, but not merely to scurvy. Even though Palladin insisted that the disturbance of creatine metabolism

in experimental scurvy originates in the disturbance of carbohydrate metabolism in such animals, the fact that the disturbance of carbohydrate metabolism cannot be recognized in the case of complete diet (with the exception of vitamin C) as Nagayama, Machida and Takeda reported, seems to confirm our opinions mentioned above.

VI. CONCLUSION.

1. In the case of experimental scurvy, the amount of creatine in the urine increases also the creatinine coefficient rises. On the contrary, no variation is seen in the amount of creatinine.

2. The amount of creatine in the muscle is almost the same as in the normal.

3. The amount of uric acid does not differ from that of the normal and it is rather apt to decrease towards the latter period.

4. In comparing with the control, the amount of ammonia increases in some degree.

5. Also in the case of the guinea pig in starvation, the creatinine coefficient rises, increasing the amount of creatine in urine.

6. The amount of creatine in the muscle of the guinea pig in starvation is less than that of the normal.

REFERENCES.

- Benedict, S. R. and Franke, E. (1922): J. Biol. Chem. 52,
Folin, O. (1914): J. Biol. Chem. 17.
Holst, A. und Frölich, T. (1907, 1912, 1913): Z. f. Hygiene und Infektionskrankheiten.
Marshall, E. K. (1913): J. Biol. Chem. 14.
Nagayama, T., Machida, H. and Takeda, Y. (1928): J. of Biochem. 10, 17.
Palladin, A. (1924): Biochem. Z. 152.
Sherman, H. C. (1922): Sherman and Smith, the Vitamins.

Additional writing:.

The subsidy for natural science by the Educational Department was applied toward the expense of this study.

STUDIES ON THE BEHAVIOR OF CHOLESTEROL WITHIN THE ANIMAL BODY.

I. A method recommendable for cholesterol estimation in any kind of tissue.

By

JINYE ONIZAWA.

(From the Biochemical Institute, Tokyo Imperial University.

Director: Prof. Samuro Kakiuchi.)

(Received for publication, July 26, 1928.)

INTRODUCTION.

For long time studies attempting to elucidate the role of cholesterol in a living organism have been very numerous. Still, however, the behavior of cholesterol in the animal body remains poorly known and any additional knowledge therefore is quite acceptable. Interested in this line of work I made some studies regarding the cholesterol contents of tissues under various conditions and the results will be reported shortly. In the course of my study it became necessary to work out a reliable method for determining the cholesterol content in tissue. In this communication a method is described which is suitable for the determination of cholesterol in any kind of tissues.

The method of determination of cholesterol naturally consists of two principal parts:

1. Extraction of cholesterol from tissue.
2. Quantitative determination of cholesterol in the extract.

Part I. Extraction of cholesterol from tissue.

To extract cholesterol from tissue entirely and in a relatively pure state is a very difficult task. Among numerous methods of extraction so far worked out by previous workers the best one is that devised by J. Fex (1920). Summarily it is as follows:

Finely divided tissue is introduced into approximately two times its volume of a 2% caustic soda solution and the mixture is heated on a boiling water-bath from one half to one hour. In this procedure the tissue is completely dissolved in the warm alkali, and cholesterol and its ester suffer no change. This alkaline mixture is then transferred into a separating funnel and shaken with ether for the extraction of cholesterol.

Trying to use this method of extraction however I met serious difficulties with some kinds of tissue.

In the case of liver two successive extractions with 150 cc. each of ether yielded 98.3% of cholesterol leaving only 1.7% for the third extraction, the fourth extract containing no trace of cholesterol. Free cholesterol added to the tissue was also recovered to the extent of 98.6% by the procedure. Therefore I believe that this extraction method is quite reliable for the determination of cholesterol in liver. (These determinations were made by means of digitonin as described below). When, however, used for some other tissues of a rabbit Fex's method failed to give a fair value. For instance, the extraction of cholesterol from whole blood by that method was never complete, even though the extraction with ether was repeated many times. I discovered this first with whole blood. From early times cholesterol extraction from whole blood was a difficult problem. In the works of Shimidzu (Shimidzu, *Bioch. Zeit.* 28. 1910) who used the Kumagawa-Suto's method for fat determination, I found on computation of the figures that the extraction was more incomplete for whole blood than for plasma and only in combination with alcohol extraction could he extract cholesterol in large quantities.

Again looking through the tables of Thaysen one can not help thinking that he indorsed the view of greater difficulty of extraction of cholesterol ester than of free cholesterol.

TABLE I.
Result obtained by Shimidzu.

	Combined alcoholic extraction	Direct saponifica- tion	% of incomplete- ness of direct method
10 cc. defibrinated horse blood (1)	0.0133 gm.	0.0079 gm.	— 40.7%
10 cc. „ „ blood (2)	0.0090 gm.	0.0056 gm.	— 37.8%
20 cc. horse serum	0.0177 gm.	0.0164 gm.	— 7.35%
20 cc. „ „	0.0123 gm.	0.0120 gm.	— 2.44%

TABLE II.
Result obtained by Thaysen.

		Ether extraction		Alcohol extraction		NaOH + Ether	
	Trocken- substanz (g)	frei mg	geb mg	frei mg	geb mg	frei mg	geb mg
Ochsenblut- körperchen	6 675	32.2	1.5	—	0.5	—	1.2
	12.777	50.4	0.3	—	0.7	—	2.9
Ochsen Serum	4.171	1.4	11.5	21.1	56.4	16.8	8.7
	7.230	1.3	3.9	20.1	51.2	7.3	5.5
	8.770	0.5	2.5	7.5	46.7	4.1	3.2
	106.06	0.5	.6	12.5	50.3	2.3	2.6
	9.484	—	—	13.8	30.5	5.4	2.1
	1 910	1.3	1.6	—	—	21.6	21.6

Using Fex's method for horse plasma I found that cholesterol was removed completely by three times extraction with ether.

With the whole blood, however, the extraction of cholesterol becomes very incomplete in spite of several repetitions.

I. THE EXTRACTION OF CHOLESTEROL FROM THE BLOOD
BY FEX'S METHOD.

Experiment 1.

To about 10 cc. of horse blood, weighing 10.4710 gm., were added about 20 cc. of a 2% caustic soda solution and the mixture was left to stand for 4 hours, then placed for 1 hour on a boiling water-bath. After the liquid had been cooled it was extracted with ether, three times with 150 cc. each and the fourth with 50 cc. of ether. As will be shown in table III this extraction of cholesterol by the Fex procedure were found to be quite incomplete (extracted amount being 0.00415 gm) and several repeated extractions (5th to 9th extraction with 50 cc. ether each time) failed also to attain the end as is shown also in the table (yielding 0.00315 gm. of cholesterol).

TABLE III.

Method of extraction	No. of extraction	Amount of cholesterol-extraction
Fex's method	1—4th	0.00415 (containing 0.00400 gm. of free cholesterol.)
Further extraction with 50 cc. of ether	5th	0.00046
	6	0.00087
	7	0.00088
	8	0.00044
	9	0.00050
Further extraction with 50 cc. of ether on addition of 20 cc. of alcohol	10th	0.00398
	11th	()
Total		0.01128

That it is very difficult to extract from the alkaline solution lipoids and particularly phospholipin and cholesterol ester may be

perceived from N. Fujii's experiment (1924) in meeting the difficulties of extracting lecithin with ether in an alkaline solution, probably due to their great tendency for hydration in the watery solution. As the presence of alcohol may naturally hinder the degree of hydration, extraction by ether will become easier by the addition of alcohol. This is probably why Grigaut used alkaline alcohol in his method to get a good result.

Reasoning in this way I tried to facilitate the extraction by adding alcohol.

20 cc. of absolute alcohol were poured into the remaining alkaline solution, well mixed and then 50 cc. of ether added, shaken thoroughly and left to separate. Extraction was repeated also with another 50 cc. of ether. This treatment gave another yield of 0.00398 gm. Further extraction with 50 cc. of ether gave no cholesterol more.

Experiment 2.

In the foregoing experiment it is shown that the Fex method extracts only a small part of cholesterol present in the whole blood, a larger part of the total cholesterol remaining unextracted by his method.

In this experiment concentration of caustic soda was increased to 3 and 4 percent. The extraction remained, however, always incomplete, and only upon the addition of alcohol was it promptly completed. The results are shown in table IV-a and IV-b.

Experiment 3.

In this experiment amount of free cholesterol and cholesterol ester was determined separately in both extract, one obtained by Fex's method and the other obtained further on addition of alcohol. The results are given in table V. In A column of the table are given results obtained by Fex's method. In B column results by the extraction with the addition of alcohol on the material extracted by Fex's method.

TABLE IV-a.

The concentration of caustic soda: 3%.

The amount of blood: 10.4490 gm.

Method of treatment	No. of extraction	Amount of cholesterol extracted
Fex's method	1—4th	0.00595
Further extraction with 50 cc. of ether	5 „	0.00125
	6 „	0.00091
	7 „	0.00070
	8 „	0.00033
	9 „	0.00025
Further extraction with 50 cc. of ether on addition of 20 cc. of alcohol	10 „	0.01213
	11 „	0
Total		0.01152

TABLE IV-b.

The concentration of caustic soda: 4.0%.

The amount of blood: 10.4650.

Method of treatment	No. of extraction	Amount of cholesterol extracted
Fex's method	1—4th	0.00542
Further extraction with 150 cc. of ether	5 „	0.00140
	6 „	0.00116
	7 „	0.00049
Further extraction with 50 cc. of ether on addition of 20 cc. of alcohol	8 „	0.00307
	9 „	0
Total		0.01154

TABLE V.

A. Part of cholesterol extracted by Fex's method.

B. Part of cholesterol unextracted by Fex's method.

Amount of blood used gm.	Concentration of caustic soda.		Amount of cholesterol.		
			Free cholesterol.	Ester cholesterol.	Total cholesterol.
10.4630	2%	A	0.00500	0.00102	0.00602
		B	0.00203	0.00387	0.00590
10.4720	3%	A	0.00430	0.00020	0.00450
		B	0.00290	0.00300	0.00590
10.4740	4%	A	0.00340	0.00085	0.00425
		B	0.00377	0.00280	0.00657

As is seen from the above experiments Fex's method used for the cholesterol determination in blood is not efficient. The extraction of ester-cholesterol in particular is incomplete, while it becomes complete, when further extracted on the addition of alcohol.

II. EXTRACTION OF CHOLESTROL FROM THE BLOOD ON ADDITION OF ALCOHOL OR ACETONE AFTER THE ALKALI TREATMENT.

Experiment 4.

The previous experiments indicate that though it is difficult to extract cholesterol and particularly its ester from whole blood by Fex's method, the addition of alcohol facilitates the extraction. Next I tried to find out the effect of alcohol on the extraction when added from the very beginning.

A. To 10.4805 gm. of blood were added 20 cc. of a 2% caustic soda solution and the mixture was heated for one hour on a boiling water bath. After cooling 20 cc. of pure alcohol were poured into the mixture and cholesterol is extracted twice with 100 cc. and twice with 50 cc. of ether.

Free cholesterol0.00650 gm.
 Ester cholesterol0.00590 „
 Total cholesterol0.01240 „
 Further extraction gave no cholesterol.

B. To 10.4685 gm. of whole blood of the horse was treated with alkali and 20 cc. of pure alcohol as described above and the extraction was performed 3 times with 150 cc. of ether and once with 50 cc. ether.

Free cholesterol0.00632 gm.
 Ester cholesterol0.00583 „
 Total cholesterol0.01215 „
 Further extraction gave no cholesterol.

These experiment clearly show that the extraction of cholesterol with ether can be easily completed upon the addition of alcohol to the mixture from the beginning and by trial I have confirmed that the amount of alcohol to be added is 20 cc. and three times extraction with 100 cc. of ether are enough.

C. 10 cc. of horse blood weighing 10.6230 gm. The addition of 20 cc. of alcohol and three times extraction with 100 cc. of ether gave 0.01254 gm. of total cholesterol. Further addition of 20 cc. of alcohol and extraction with 100 cc. of ether gave no trace of cholesterol.

Experiment 5.

For the facilitation of the extraction of cholesterol with ether acetone can be used instead of alcohol. This can be seen from two following experiments in which the results are compared with each other.

1. *Alcohol extraction.* To 10 cc. of horse blood was added 20 cc. of alcohol before the extraction and it was extracted three times with 100 cc. of ether each. The amount of cholesterol extracted was 0.01226 gm. Further addition of 20 cc. of alcohol and extraction of ether gave no trace of cholesterol.

2. *Acetone extraction.* 10 cc. of horse blood was treated just the same, using acetone instead of alcohol. The cholesterol extracted was found to be 0.01230. No further amount was extracted even on the addition of alcohol. The result is therefore the same in both cases. While with alcohol the final extract from the blood gave a slightly reddish colour, that with acetone was colourless. I have therefore used acetone in all my subsequent experiments.

III. THE COMPARISON OF THE EFFECTIVENESS IN EXTRACTION BETWEEN FEX'S AND NEW METHODS.

In the following comparion was made of Fex's method and those which add alcohol and acetone. Results obtained for the whole blood are tabulated in table VI.

TABLE VI.

Method of extraction.		Fex's method. gm.	New methods.	
			Acetone method. gm.	Alcohol method. gm.
Amount extracted.	1. Extraction	0.00020	0.01172	0.01100
	2. „	0.00610	0.00028	0.00055
	3. „	0.00133	trace	0.00028
	Total	0.00763	0.01200	0.01183
Amount remaining unextracted.		0.00401	0	0

As is clear from the table Fex's method is entirely unreliable in case of whole blood.

*The organs with which Fex's method fails to give a true
cholesterol value,*

The efficiency of Fex's method for liver is verified already by preceding experiments, while his method is quite imperfect for blood. The latter may only be determinable by the addition of

alcohol or acetone — the procedure by which the time of extraction also may be considerably shortened.

How is then the reliability of Fex's method in relation to other organs? In this respect the various organs of a rabbit were examined.

1) Organs which gave satisfactory results with Fex's method (extraction complete): liver, heart, testicle, muscle, mucous membrane of the stomach, bile and spleen.

2) Organs which at times gave inefficient results with Fex's method (extraction partly incomplete) suprarenal gland, kidney, blood-plasma.

3) Organs which gave altogether unsatisfactory results with Fex's method (extraction always incomplete) blood, skin, brain; error is particularly great for blood and skin; however if extraction were conducted after the addition of acetone or alcohol it becomes complete.

IV. PROCEDURE OF EXTRACTION OF TISSUE.

1. Tissue is minced finely and with addition of about twice its volume of 2% caustic soda solution is left to stand for several hours. By this time the tissue is swollen.

2. Then the mixture is transferred to the boiling water-bath for 30–60 minutes until the tissue is quite dissolved and the liquid becomes semitransparent.

3. After allowing the liquid to cool it is transferred into 200–250 cc. separating funnel; beaker is washed several times with few cc. of water and all put in to the separating funnel.

4. Then the beaker is washed again with 20 cc. of acetone and washed liquid is added into the funnel. The funnel is thoroughly shaken in order to get the acetone well mixed with the content. Next the beaker is washed with 100 cc. of ether which is also transferred into the separating funnel. Then it is shaken vigorously to extract the cholesterol and the funnel is put aside for 15–30 minutes to separate. The lower layer is cautiously drawn

into another separating funnel and the remaining ether transferred from the upper opening into a bigger separating funnel. The first funnel is washed with a little ether and the washings are transferred into the bigger funnel. It is convenient to use for that purpose a 500 cc. funnel.

5. The smaller funnel is well washed with 100 cc. of ether and this is poured into the second separating funnel containing the tissue liquid for the extraction of remaining cholesterol.

6. Such procedure must be repeated twice, that is to say 300 cc. of ether has to be used.

7. All of those ether extracts are transferred again into a big separating funnel and washed twice with 5–10 cc. of alkaline water for removal of fatty acids and other foreign substances.

8. The funnel is again twice washed with distilled water until its reaction becomes neutral.

9. Now the ether is evaporated by placing the beaker containing the ether extract on a warm water-bath with extinguished flame and by gentle fanning. After the evaporation of ether, the residue is well dried, first on the water-bath and then in a drying oven at about 80°C.

10. Residue is then taken up by pure ether and filtered through a Kumagawa-Suto asbestos filter.

11. After the evaporation of ether from this filtrate its residue, being still warm, is treated with about 10 cc. of acetone and left to stand for more than 4 hours. Meanwhile particles insoluble in acetone will precipitate. Mixture is again filtered through the asbestos filter, the filtrate evaporated, and the residue now dissolved in chloroform or ether to a definite volume ready for determination. It is a colorless or slightly yellowish solution containing pure cholesterol and its ester only.

Part II. Determination of Cholesterol.

There are many methods proposed for the determination of cholesterol. They may be divided into the three following groups.

1. The most reliable one is the digitonin gravimetric method by Windaus. By this method cholesterol is precipitated as a digitonin compound of cholesterol (Digitonin-cholesteride) of large molecular weight and is determined gravimetrically.

2. Colorimetric estimation which may be again subdivided into two; a) is based on an application of the Liebermann-Burchard's reaction and b) on Salkowsky's reaction.

In this group may be included spectroscopic estimation and other methods founded on colour reactions.

3. Volumetric micro-estimation of cholesterol by Bang and by Szent-Györgyi. There exist again indirect ways of cholesterol estimation by means of saponin hemolysis and finally the nephelometric method.

All of these methods, gravimetric and colorimetric, are used in biochemistry.

Most scholars particularly Thaysen (1914) J. H. Müller (1916), J. Fex (1920), J. Feigl (1920), J. H. Gardner and M. Williams (1921), J. H. Gardner and F. W. Fox (1924) give their preference to the gravimetric method as being the most reliable. The colorimetric method must be applied with great caution, particularly is its value quite questionable as regards tissue cholesterol. Moreover in colorimetric estimation its reliability varies with the method and the subject employed. Therefore in the case of colorimetric estimation its use must be described in detail.

In colorimetry not only cholesterol but cholesterol like bodies give the same colour reaction, besides these cholesterol bodies are partly disintegrated by strong alkali. That is why I at first made the estimation in the three following ways:

- 1) Colorimetric estimation of cholesterol and cholesterol like bodies.
- 2) Gravimetric estimation of free cholesterol.
- 3) Total cholesterol after saponification.

However I ascertained that Liebermann-Burchard's reac-

tion applied to the tissue's extract is subject to many interfering influences. The result of the colorimetric method agrees pretty well with that of the digitonin method in the case of the blood's or plasma's extract (to the limit of 10%). For one or two other tissues, for instance, liver and spleen, the results are also comparatively close; for most organs, however, the differences are a great deal. When examined with the extract of cholesterol from various tissues obtained as described in the first part of this report, the development of the colour is delayed in most cases, and sometimes the colour reaches its full intensity only in 30 minutes, contrary to other cases where the intensity is the highest in 15 minutes. When the speed of reaction is slow, the difficulty of determining the depth of colour are really great. That the colorimetric determination results in a great error can be seen from the following example.

Extract from suppurenal gland submitted at once	
to Liebermann-Burchard's reaction	0.01109 gm.
do examined by Bloor's method (1922).	0.01800 „
do by digitonin method	0.02040 „

For most tissues, when the extract is dissolved in alcoholic soda and kept on a water bath for 6 hours for saponification, the results of both digitonin and colorimetric methods become almost alike. With suprarenal gland, brain and skin, however, readings in colorimetric estimation are still 10 to 20% low. Thus I think the determination of cholesterol like bodies by means of colorimetry is not reliable.

The digitonin method besides enables us to determine the amount of free cholesterol and that of ester cholesterol separately. As will be shown in the next communication the determination of total cholesterol only has hardly any meaning biochemically and a separate determination of both kinds of cholesterol is required. I therefore prefer the digitonin method to the others and chiefly the digitonin method of Szent-Györgyi was followed. As how-

ever there seem some modifications preferable I describe in the following the procedure I adapted.

I. The determination of free cholesterol.

1. Cholesterol which is to be determined (about 1-3 mg) is dissolved in 2 cc. of pure acetone in a small beaker. 2 cc. of 1% alcoholic solution of digitonin (80% alcohol) is then added and the mixture is left to stand overnight.

2. Next day it is taken by 80% acetone into a centrifugal tube; (Tominaga's method, 1925) the tube is immersed into a water bath kept for 5-10 minutes at a temperature of 40-50°C., stirring the contents occasionally with a glass rod. After being centrifuged the supernatant liquor is poured upon Szent-Györgyi's asbestos filter.

3. The beaker is then washed with 80% acetone and the washing transferred into a centrifugal tube. The precipitate is again washed as before, then centrifuged and this is repeated once more using each time about 7-10 cc. of 80% acetone.

4. Then precipitate is covered with pure acetone at the room temperature, well stirred with a glass rod and completely transferred to Szent-Györgyi's asbestos filter.

5. The precipitate on the filter is washed 3 times with portions of 5 cc. of ether, which have been used for rinsing of the centrifuge tube. Before the suction it must be well stirred up with a glass rod, then dried by suction with a water pump and washed again by ether.

6. Washed once more with pure acetone.

7. Washed several times with small quantities of distilled water.

8. Dried in a special vacuum thermostat at 105°C.

9. The precipitate is dried until a constant weight is obtained at microbalance.

10. Weighing of substance during desiccation is done after the method of Szent-Györgyi.

11. The error of this method does not surpass 3%. This is verified by the experiment, in which 1.00 mg. of cholesterol added to a definite amount of brain extract was recovered to 97%. The result of this experiment is shown in table.

TABLE VII.

Chloroform solution containing 1.00 mg. of cholesterol.

No. of determinate	Digitonin cholesteride	Cholesterol	% of error
1	4.15 ^{mg}	1.009 ^{mg}	+0.88
2	4.21	1.023	+2.34
3	4.11	0.979	-0.09
Average		1.004	

Brain Extract

1	7.48	1.82	
2	7.46	1.81	
3	7.30	1.80	
Average		1.80	

Brain extract + 1 mg. of cholesterol.

1	11.61	2.87	
2	11.41	2.78	
3	11.50	2.80	
Average		2.77	

Cholesterol recovered $2.77 - 1.80 = 0.97$ mg.

II. The determination of ester cholesterol.

Of course when we precipitate cholesterol by means of digitonin it is only free cholesterol that precipitates. Therefore

when one wishes to determine the cholesterol ester we must saponify the extract completely previous to precipitation. The difference between the total cholesterol and free cholesterol gives the amount of ester cholesterol.

Now again for the determination of the total cholesterol by saponification with alcoholic soda a loss of 2-3% is usually sustained. Thus instead of 0.2431 to be multiplied to the amount of digitonin cholesteride to get cholesterol value we have to take 0.25 (i.e. divided with 4) to be multiplied in this case.

Saponification: After trying many saponifications methods as proposed by Gardner, Thaysen, Flex and others finally I found it convenient to heat the mixture for 6 hours on a boiling water bath under a reflux condenser with saturated alcoholic soda. The alkali must be taken in a quantity at least 10 times greater than calculated. Extraction is done exactly as described in part I.

As here alcohol is already present in the alcoholic soda solution used for saponification, it is not necessary to add any extra alcohol previous to extraction. The saponified solution is therefore transferred with 100 cc. of ether and washed in several portions and finally the vessel is washed several times with small quantities of water and the washings poured also into the funnel, and further extracted.

CONCLUSION.

1. For extraction of cholesterol and its ester from tissue Flex's method is useful for certain organs. It is, however, not efficient for others as blood, skin, brain, suprarenal gland etc.

2. In this communication are described suitable methods for the extraction and determination of cholesterol from many organs, tissues and blood.

I wish to express my sincere thanks to Prof. S. Kakiuchi for his kind advice throughout the course of the investigation.

REFERENCES.

- Bloor and Knudson, (1916), *J. of Biol. Chem.* **27**, 107.
Bloor, Pelkan and Allen, (1922), *J. of Biol. Chem.* **52**, 191.
Feigl, J., (1920), *Z. ges. exp. med.* **11**, 178.
Fex, (1920), *Biochem. Z.* 104-105, 82.
Fujii, N., (1924), *J. of biochem.* **3**, 393.
Gadner, A. and Williams, M., (1921), *Biochem. J.* **15**, 363.
Gardner, A. and Fox, F. W., (1924), *Biochem. J.* **18**, 1058.
Grigaut, (1913), *Le cycle de la cholestérinémie*. Paris.
Müller, J. H., (1916), *J. Biol. Chem.* **25**, 549.
Szent-Györgyi, (1923), *Biochem. Z.* **136**, 107.
Thaysen, (1914), *Biochem. Z.* **62**, 89.
Tominaga, (1925), *Biochem. Z.* **155**, 119.

STUDIES ON THE PHOSPHORUS INTOXICATION OF RABBITS.

BY

ATUSI HURUYA.

(From the Department of Biochemistry, Niigata Medical College, Niigata.)

(Received for publication, July 27, 1928.)

I. INTRODUCTION.

It is not necessary here to enumerate the roles, which are played by the liver in the physiology of animal life. Almost all of the constituents of foodstuffs, which are absorbed by the intestinal wall, run through the liver to get their contact with acting cells. On the other hand many kinds of metabolic products are transformed there into less toxic substances. It also produces bile, which may be regarded partly as a digestive fluid containing bile salts and other substances necessary to promote the digestion, and partly as an excrete containing bile pigments, free cholesterol and many inorganic substances. It is obvious then that if this organ is damaged to a certain extent anomalies may appear in many different directions.

This has been studied by many investigators partly by clinical experiences and partly by experimental methods. Under the latter phosphorus intoxication enjoyed special attention. It has been found in the case of phosphorus poisoning that oxidation is thereby very much damaged, that the formation of urea is not complete, and that the lypolytic function is greatly decreased, so that the liver is filled with incoming fat till it becomes a fatty liver. The manifestation of the intoxication is however sometimes quite different and this description is not confirmed by many investigators.

With the idea in mind to compare the histological changes with the chemical ones and to get a more complete idea on many

different symptoms I made a thorough investigation of the chemical changes in the liver, blood, and urine of intoxicated animals and the main features of the results are reported in this paper.

About 140 rabbits were used in all and whenever the animals were dead or killed the histological examinations were performed.

In some 40 animals the chemical analysis of the urine, blood and liver was performed with the same individual and the results obtained were thoroughly cross examined.

II. THE METHODS.

1. *Animal.*

Throughout all my experiments only male rabbits of about 2 kilo body weight were used. Before the experiment all of the animals were fed daily on 300 gm. of Okawa for a week.

Each animal was then injected subcutaneously with a one per cent solution of yellow phosphorus in olive oil, 5 mg. per kilo body weight. For the preparations of the phosphorus solution 1 gm. of phosphorus was dissolved into 10 cc. of hot absolute alcohol and the solution was well mixed with nine times its volume of olive oil. After the lapse of different lengths of time, mainly at 8, 16, 24, 32, 40 and 48 hours after the injection, the animals were killed for an analysis of the liver.

Directly previous to the killing a sample of blood was taken from the ear vein of the animal and subjected to analysis. The analysis of the urine was also undertaken once previous to the experiment and each day during each experiment. The method of analysis used was as follows.

2. *Liver.*

Immediately after the death of the animal the liver was taken out, cleaned of blood and weighed. The major part of the organ was then cut into small pieces with scissors, minced in a porcelain

mortar to the state of a paste and passed through a sieve of fine mesh. The mass was subjected directly to an analysis. A minor portion of the liver was fixed with formalin for the microscopical examination.

a) *Water content*—A certain amount of the liver paste was taken in a small beaker of known weight and dried in an electric oven at 100–110°C for about 4 hours to weight constancy. The difference between the weight of the fresh and the dried sample is taken as the water content.

b) *Total nitrogen*—Kjeldahl's method.

c) *Residual nitrogen*—A certain amount of the paste was weighed out and freed from protein with metaphosphoric acid, the filtrate being used for kjeldahlization.

d) *Total fatty acid and unsaponifiable substance*—Kumagawa-Suto's method (1908).

e) *Polypeptide nitrogen*—The jugular vein of the animal was cut at a definite time after the phosphorus injection and in a centripetal direction Ringer's solution was infused, while the blood was bled from the cut end of A. carotis. The washing was continued until the outcoming fluid became colourless. The liver, which was gray white, was taken out, wiped of water and the paste was made just as mentioned above.

About 2 gm. of the resulted organ paste were weighed into a 100 cc. measuring flask, 10 cc. of a 20 percent. solution of trichloroacetic acid were added and then water up to the mark. After a thorough shaking it stood for one hour and then the precipitates were filtered off. A definite amount of the filtrate was kjeldahlized and the amount of nitrogen was thus determined. On the other hand the same quantity of the paste was treated with phosphotungstic acid, the amount being 1%. The difference in nitrogen value of these two determinations is assumed as the amount of the polypeptides.

f) *Lecithin and total cholesterol*—Morita's method (1924).

Some modifications introduced were: 1) the water contents

and analysis of other substances were determined with different samples of paste. 2) The period of hot alcoholic extraction was prolonged to 12 hours. 3) The Soxhlet extraction with absolute ether had a duration of 24 hours. 4) The determination of total fatty acids and cholesterol was performed according to the methods mentioned under the head of blood.

g) *Free cholesterol and ester cholesterol*—The determinations of these substances were conducted by the method of Onizawa (1928).

A slight modification lies only in the difference of quantity i.e. 20 gm. of liver paste necessitated a corresponding increase of the solvent. The saponification time of cholesterol esters was prolonged to 12 hours. The weighing of digitonincholesterid was made by means of Gooch's crucible, as the larger quantity of the material in my case did not necessitate the application of Szent-Györgi's asbestos filter.

3. Blood.

About 10 cc. of arterial blood were taken from the ear vein of the animal into a weighing bottle containing 0.1 cc. of saturated sodium citrate solution to prevent the formation of a clot.

2 cc. of the blood were used for the determination of total nitrogen, while with each 3 cc. of the remainder the determination of residual nitrogen and that of lipid were performed.

a) *Total nitrogen*—Kjeldahl's method.

b) *Residual nitrogen*—The removal of protein by the addition of 25% solution of metaphosphoric acid (the final concentration of the acid was one per cent of the solution), followed by the kjeldahlization of the filtrate.

c) *Total fatty acid and cholesterol*—Bloor's method (Bloor, 1915).

d) *Lecithin*—Bloor's method (Bloor, 1918).

e) *Hemoglobin*—Sahli's method by the use of a fresh sample of blood.

f) *Inorganic and ethereal sulphate*—50 cc. of blood obtained from 3 rabbits in the same condition were used for the determination of the total and inorganic sulphate by Denis and Reed's gravimetric method (1926) (the coagulation being prevented by the addition of 0.1 cc. of saturated sodium citrate for each 10 cc. blood).

g) *Polypeptide nitrogen*—The content of the polypeptide nitrogen in the blood was carried out as follows,

Each 3 cc. of oxalated blood were measured into two measuring flasks and the one was deproteinized with 2.5% trichlor acetic acid, while the other was treated with 1% phosphotungstic acid. Both flasks were filled with distilled water up to the mark and the nitrogen content of each of the filtrates was determined by Folin's Microkjeldahl method. The difference in these two values is considered as a measure of the polypeptide nitrogen.

h) *The dysdesamination coefficient*—About 25 cc. of blood were obtained from each rabbit, previously starved for 24 hours, and decalcified by the addition of potassium oxalate and centrifuged. In the separated plasma determination was made of the urea by the van Slyke and Cullen urease method (1914), of polypeptide nitrogen by the method mentioned above in the previous section for liver, and of amino acid nitrogen by the Folin's methods (1922). From these figures of three kinds of nitrogen the dysdesamination coefficient proposed by Cristol, Puech and Trivas (1927) was calculated. This coefficient tells us about the functional condition of the liver, provided the function of the kidney is not severely damaged.

4. Urine.

The urine for 24 hours was collected into a glass bottle containing a sufficient amount of toluol to prevent bacterial fermentation. The last trace of urine in the bladder was naturally taken out by catheterization and was added to the urine in the bottle. The total volume of urine was read by means of a measuring

cylinder and with a definite amount of the well mixed urine the following determinations were performed.

a) *Total nitrogen*—The urine containing protein was treated with metaphosphoric acid to remove the protein. The total nitrogen of the urine was then determined with the filtrate by Kjeldahl's method.

b) *Urea N and Ammonia N*—van Slyke and Cullen's method (1914).

c) *Alkalinity*—To 10 cc. of the urine were added 50 cc. of distilled water and then it was titrated with $n/25$ HCl using methylorange as an indicator.

d) *Sulphur compound*—The urine was collected every 48 hours and the amounts of total sulphur, neutral sulphur, inorganic and ethereal sulphate were determined by Folin's method. In the determination of total sulphur the Benedict oxidation method (1909) was followed. In case of albuminous urine the protein was removed just as mentioned above previous to all of these determinations.

e) *Oxidation coefficient*—The oxidation coefficient of the urine was determined by the method of Müller (1927) with the urine collected during 24 or 48 hours. The deproteinization of urine was effected by heat coagulation of the urine, carefully acidified with a 2% solution of phosphoric acid.

5. *Microscopical examination.*

Small pieces of liver and kidney were fixed with formalin and stained by the three following methods.

a) *Paraffine imbedding*—Hematoxyline-eosin dying.

b) *Paraffine imbedding*—dyed after van Gieson.

c) *Gelatine imbedding*—dyed with Sudan III.

The degree of pathological change was judged by the amount of fatty degeneration. When there existed only some minute droplets in the cell the degeneration is called a mild one, while when the cells were occupied entirely with large fat droplets it

represented a case of severe degeneration. Figures between these two extremes are classified as moderately severe ones. The author is greatly indebted to Prof. Kawamura of the pathological institute for his kind help in the pathological examinations.

III. THE CHANGE IN THE URINE.

I. The excretion of total nitrogen, urea and ammonia nitrogen in a phosphorus intoxicated animal.

In a group of animals, which had lived over two days after the injection of phosphorus, the determinations of the amount of urine, specific gravity, alkalinity, total nitrogen, urea and ammonia nitrogen were undertaken. The values obtained in normal and intoxicated animals are given in Tables I, II, III and IV.

TABLE I.

The amount of total nitrogen, urea and ammonia nitrogen in the urine of a normal rabbit.

Rabbit		Amount of urine	Sp. gr.	Alkali- nity	Total N.	Urea N.	Am- monia N.	Urea N	Am. N
No.	Weight							Total N	Total N
	gm.	cc.			gm.	gm.	gm.	%	%
46	1970	225	1.011	11.5	1.901	1.781	0.0164	93.68	0.86
47	1900	180	1.013	10.0	1.221	1.105	0.0109	90.49	0.89
48	2100	230	1.011	10.8	1.527	1.463	0.0084	95.81	0.54
49	1920	175	1.020	8.5	1.708	1.519	0.0166	88.93	0.97
50	1840	210	1.018	10.7	2.012	1.823	0.0118	90.60	0.59
51	1840	190	0.018	9.4	1.830	1.142	0.0169	93.56	0.92
52	2000	160	1.020	9.2	1.827	1.603	0.0099	87.74	0.54
53	2080	256	1.016	8.3	2.360	2.163	0.0070	91.65	0.29
54	2050	130	1.021	12.9	1.308	1.166	0.0065	89.14	0.50
55	1850	185	1.019	9.7	1.865	1.625	0.0124	87.13	0.66
Average		149		10.1	1.756	1.539	0.0117	90.87	0.63

TABLE II.
The amount of total nitrogen, urea and ammonia nitrogen in urine phosphorus intoxicated animals.

Rabbit No.	Date 1927	Weight gm.	Amount of urine cc.	Sp. gr.	Alkalinity	Total N gm.	Urea N gm.	Ammonia N gm.	Food (Okara) gm.	Injektion of Phosphorus	Albuminuria	Degree of intoxication
46	Jan. 8	1970	225	1.011	11.5	1.901	1.781	0.0164	300	10 A.M.	-	mild
	9	1950	165	1.012	14.0	1.877	1.688	0.0188	300		-	
	10	1960	65	1.032	14.2	0.972	0.852	0.0215	300		+	
47	8	1900	180	1.013	10.0	1.221	1.105	0.0109	300		-	moderately severe
	9	1910	130	1.013	16.5	1.058	0.829	0.0156	300	10 A.M.	-	
	10	1880	100	1.020	34.6	0.991	0.713	0.0554	240		+	
48	8	2100	230	1.011	10.8	1.527	1.463	0.0084	300		-	moderately severe
	9	2200	145	1.015	11.0	1.218	0.993	0.0487	300	10 A.M.	-	
	10	2180	100	1.020	12.2	0.822	0.614	0.0470	300		+	
50	14	1840	210	1.018	10.7	2.012	1.823	0.0118	300	11 A.M.	-	severe
	15	1860	185	1.019	12.4	1.341	1.006	0.0290	300		+	
	16	1860	105	1.030	24.6	0.647	0.344	0.0552	200		+	
51	14	1840	190	1.018	9.4	1.830	1.142	0.0199	300		-	severe
	15	1920	140	1.016	12.3	0.671	0.517	0.0323	300	11 A.M.	-	
	16	1800	110	1.027	26.2	0.592	0.282	0.1183	100		-	
52	17	2000	160	1.020	9.2	1.827	1.603	0.0099	300		-	moderately severe
	18	2030	140	1.026	10.5	1.764	1.512	0.0101	200	10 A.M.	-	
	19	1930	55	1.032	12.0	1.296	0.205	0.0056	0		+	

TABLE III-A.

The change of urinal constituents of rabbit in phosphorus poisoning.

No. of rabbit	Total N					$\frac{\text{Urea N}}{\text{Total N}} \times 100$				
	a	b	c	$\frac{b-a}{a} \times 100$	$\frac{c-a}{a} \times 100$	a	b	c	$\frac{b-a}{a} \times 100$	$\frac{c-a}{a} \times 100$
	gm.	gm.	gm.							
46	1.901	1.877	0.972	- 1.26	-48.87	93.68	89.93	87.65	- 4.00	- 6.44
47	1.221	1.058	0.991	-13.35	-18.84	90.49	78.35	71.94	-13.42	-20.50
48	1.527	1.218	0.822	-20.24	-46.17	95.81	81.52	74.69	-14.92	-22.04
50	2.012	1.341	0.647	-33.35	-67.84	90.60	75.01	53.16	-17.21	-41.32
51	1.830	0.671	0.592	-63.33	-67.65	93.56	77.04	47.63	-17.66	-50.70
52	1.827	1.764	0.296	- 3.45	-83.80	87.74	85.71	69.25	- 2.31	-21.07
Average	1.720	1.322	0.720	-22.50	-55.53	91.98	81.26	67.39	-11.59	-27.01

TABLE III-B.

No. of rabbit	$\frac{\text{Ammonia N}}{\text{Total N}} \times 100$					Alkalinity				
	a	b	c	$\frac{b-a}{a} \times 100$	$\frac{c-a}{a} \times 100$	a	b	c	$\frac{b-a}{a} \times 100$	$\frac{c-a}{a} \times 100$
						cc.	cc.	cc.		
46	0.86	1.00	2.21	+ 0.16	+ 1.57	11.5	14.0	14.2	+ 0.22	+ 0.23
47	0.86	1.47	5.56	+ 0.71	+ 5.46	10.0	16.5	34.6	+ 0.65	+ 3.46
48	0.54	3.99	5.71	+ 6.39	+ 9.57	10.8	11.0	12.2	+ 0.02	+ 0.13
50	0.59	2.16	8.53	+ 2.71	+13.46	10.7	12.4	24.6	+ 0.16	+ 1.30
51	0.92	4.79	19.98	+ 0.76	+20.71	9.4	12.3	26.2	+ 0.31	+ 1.79
52	0.54	0.57	1.89	+ 0.05	+ 2.39	9.2	10.5	12.0	+ 0.14	+ 0.30
Average	0.72	2.23	7.31	+ 1.80	+ 8.86	10.3	12.8	20.6	+ 0.25	+ 1.20

a, the day before phosphorus injection.

b, the first day and c, the second day after the injection of phosphorus.

TABLE IV.
Percentage of non-Urea-and-Ammonia nitrogen
(calculated from the data of table II).

Rabbit No.	$\frac{\text{Total N} - (\text{Urea N} + \text{Ammonia N})}{\text{Total N}} \times 100$		
	Normal	1st. day	2nd. day
		of the phosphorus injection	
46	7.18	11.07	14.56
47	8.31	23.12	23.55
48	4.74	22.47	31.02
50	9.98	27.14	55.36
51	8.68	27.74	32.38
52	12.80	14.86	32.63
Average	8.62	21.04	31.58

The amount of urine excreted after the injection of phosphorus decreased with time in all of the intoxicated animals. The alkalinity increased in a larger degree in a later stage. As will be clear from table III, the absolute amount of total nitrogen and the percentage value of urea nitrogen decreased with the increasing intoxication, while the ammonia content tends to increase. As table IV indicates, the amount of decrease in urea-N is not met with the increase of ammonia-N and the increase of nitrogen in another form is suggestive.

The change in amount of this kind of nitrogen seemed to increase reciprocally with the change in the total and urea nitrogen, while the increase of ammonia went also parallel with the increase of this kind of nitrogen.

II. *The amount of sulphur in the urine of phosphorus intoxicated animals.*

The examination of the sulphur distribution in the urine was then performed with a view to know how the oxidation of the

TABLE V-A-a.

No. of Rabbit	Date 1928	Weight	Volume of urine	Absolute amount of sulphur					Per cent of S on basis of total sulphur			
				Total sulphur	Neutral sulphur	Total sulphates	Inorg. sulphates	Ether. sulphates	Neutral sulphur	Total sulphates	Inorg. sul.	Ether. sul.
	Jan.	gm.	cc	mg.	mg.	mg.	mg.	mg.				
109	7-8	1800	310	173.55	23.25	150.30	138.41	11.89	13	87	80	7
	9	1650	100	122.12	27.87	94.25	83.17	10.54	23	77	69	8
110	7-8	1850	355	126.34	20.47	105.60	93.15	12.45	16	84	74	10
	9-10	1650	350	185.21	36.74	148.74	129.41	19.06	20	80	70	10
111	8-9	1950	300	91.08	16.37	74.71	65.71	9.00	18	82	72	10
	10-11	1830	260	116.45	31.43	85.02	73.94	11.08	27	73	63	10
112	8-9	1800	330	126.03	23.24	102.79	92.04	10.75	18	82	73	9
	10-11	1690	255	131.04	35.03	96.01	84.10	11.91	27	73	64	9
113	8-9	1630	325	157.17	28.57	128.60	117.61	10.99	18	82	75	7
	10-11	1450	315	164.46	35.47	128.99	120.73	8.26	22	78	73	5

TABLE V-A-b.

No. of Rabbit	Total N	per cent of S on basis of Total nitrogen					Albuminuria	Injection of phosphorus
		Total S.	Neutr. S.	Total sulphates	Inorg. sulphates	Ether. sulphates		
	gm.							
109	2.908	6.0	0.8	5.2	4.8	0.4	-	before
	1.176	10.4	2.4	8.0	7.1	0.9	-	after
110	2.375	5.3	0.9	4.4	3.9	0.5	-	before
	2.871	6.5	1.3	5.2	4.5	0.7	-	after
111	1.730	5.3	1.0	4.3	3.8	0.5	-	before
	1.609	7.2	1.9	5.3	4.6	0.7	+	after
112	2.438	5.2	1.0	4.2	3.8	0.4	-	before
	1.257	10.4	2.8	7.6	6.7	0.9	+	after
113	2.658	5.9	1.1	4.8	4.4	0.4	-	before
	2.073	7.9	1.7	6.2	5.8	0.4	+	after

Rabbit No. 109 died 24 hours after the injection of the phosphorus.

sulphur compound was damaged by phosphorus intoxication. The number of animals employed here was 5 and the amount of sulphur compounds and of total nitrogen was determined with the urine of 48 hours collected just before and after the phosphorus injection.

The results are given table V-A and V-B.

TABLE V-B.

The ratio of excretion of total sulphur and nitrogen of intoxicated animal to that of normal condition.

Rabbit No.	Total Sulphur	Total nitrogen	Degree of intoxication
110	1.57	1.25	mild
111	1.29	0.95	maderately severe
113	1.04	0.80	severe
112	1.04	0.50	very severe

As is clear from the table, while the excretion of nitrogen in urine is decreased, that of sulphur is always increased and the ratio S/N is increased by an amount of 30-50%. The amount of each class of sulphur is increased without any exclusion after the phosphorus injection.

The prominent feature, however, is the increase of neutral sulphur against the total sulphur. Whereas the ratio of neutral to total sulphur does not exceed the value 18 percent in normal animals, it amounts to 22-27 per cent in the intoxicated animal. The increase in this ratio seems to be proportional to the severity of intoxication.

III. The consumption of oxygen in phosphorus intoxicated animals and the oxidation quotient of their urines.

The increase in the neutral sulphur portion indicates the damage of the oxidative process within the animal body. The change in the oxidative activity in the animal body may set either in a quantitative or in a qualitative way.

It is also frequently damaged in both ways.

The change in the amount of oxidation can be easily followed by the determination of this amount of oxygen consumption during a certain period, while the change in the oxidizability of substance in the animal body can be suggested from the nature of the excreted urine constituents.

Bickel (1925) tried to get some insight into the latter by the determination of the N/C quotient of the urine, whereas Müller (1927) preferred to get an idea by the determination of the oxidation quotient (N/O) of the urine. I have examined both the quantitative and qualitative sides of the oxidative activity of the phosphorus intoxicated animal by the determination of the oxygen consumption and by the examination of the oxidation quotient.

1. The oxygen consumption of phosphorus intoxicated animals.

The amount of oxygen consumption was determined by the Krogh respirometer. The volume of the chamber in which the animal was placed was about 5 liters, and a closed circuit was made between this chamber and the Krogh respirometer, the air being driven by means of an electric pump.

The determination was carried out in the institute of Biochemistry, Tokyo Imp. University and the author wishes to thank Dr. Onizawa for helping him in carrying out the operation. The results of the experiment are given in table VI.

TABLE VI.

Rabbit		Consumption of oxygen per kilo per minute			Histological change	
No.	Weight	before	after	difference	Liver	Kidney
	gm.	cc.	cc.	%		
138	2420	9.92	8.61	-13.5	mild	mild
139	2450	8.86	5.40	-38.7	severe	mild
140	2530	8.88	7.23	-26.8	severe	severe
141	2530	9.21	7.23	-21.5	moderately severe	mild

As will be clear from the table, the reduction in oxygen consumption varies with the amount of intoxication.

2. *The oxidation quotient of phosphorus intoxicated animals.*

The degree of dysoxidizability was determined with the urine before and after the phosphorus injection, the original method being followed (Müller, 1927). In passing, it ought to be mentioned here that it is quite necessary to feed the animal with exactly the same type of ration, for when the ration varies the value of the oxidation quotient becomes quite different. Table VII shows the value of the oxidation quotient with the animals, one of which was fed on Okara, while the other was fed with carrots.

TABLE VII.
The oxidation quotient of a normal rabbit.

Rabbit	Date 1927	Weight	Volume of urine	Vakat O	Total N	Total N Vakato	Food
No. 98	Nov. 3	gm. 2220	cc. 235	0.615	gm. 0.702	1.1377	300 gm. of Okara
	4	2240	230	0.488	0.560	1.1475	„
	5	2250	185	0.609	0.644	1.0574	„
	6	2170	180	0.478	0.581	1.2154	„
	Average		208	0.548	0.622	1.1390	
No. 99	7	1910	160	0.742	0.357	0.4811	300 gm. of carrots
	8	1950	180	0.884	0.448	0.5067	„
	9	1940	175	0.695	0.301	0.4330	„
	10	1890	200	0.787	0.385	0.4891	„
	Average		179	0.777	0.373	0.4800	

The relation was found to hold always. In the following experiment therefore the ration was maintained the same. The results are shown in Table VIII.

TABLE VIII.

The oxidation quotient of rabbit in phosphorus poisoning.

Rabbit No. and of food	Date 1927	Weight	Volume of urine	Vakat O	Total N	Total N Vakat O	Amount of Food	Injection of phosphorus	Degree of intoxication
100 Okara	Oct. 27	gm. 2000	cc. 250	0.602	0.868	1.4418	300		
	28	1970	200	0.735	1.022	1.3904	300		
	29	1950	170	0.890	0.917	1.0303	300	8 A.M.	moderately severe
101 Okara	Nov. 1	1830	183	0.652	0.805	1.2346	300		
	2	1850	120	0.559	0.678	1.2128	300		
	3	1850	45	1.626	1.526	0.9384	150	8 A.M.	moderately severe
98 Okara	Nov. 5	2250	185	0.609	0.644	1.0574	300		
	6	2240	180	0.478	0.581	1.2154	300		
	7	2130	100	0.908	0.637	0.7015	0		
	8	2100	85	0.692	0.301	0.4350	Water 100 cc. 200	8 A.M.	severe
102 Carrots	Nov. 8	2500	200	0.568	0.364	0.6408	300		
	9	2510	295	0.263	0.168	0.6387	300		
	10	2450	220	0.460	0.224	0.4869	300		
	11	2430	15	1.429	0.546	0.3821	0	8 A.M.	severe

As is clear from the table, the oxidation quotient is decreased greatly by the phosphorus intoxication. The decrease proceeds according to the lapse of time after the injection, paralleled with the severity of intoxication. The decrease over 50 percent. is not rare.

When we compare the result of oxygen consumption with that of the oxidation quotient, it seems to me quite suggestive to assume that the qualitative side of oxidation is more highly damaged than the quantitative side in the case of phosphorus intoxication.

Discussion.

The changes observed in the urine of phosphorus intoxicated animals can be summarized as follows:

1. The excretion of nitrogenous matter into the urine is increased somewhat when the intoxication is mild. It decreases however as the degree of intoxication proceeds, and the amount of total nitrogen in the deproteinized urine is only half in very severe cases. The ratio of urea to the total nitrogen in the urine always decreases and that of ammonia always increases with the degree of intoxication. The ratio of non-urea + ammonia nitrogen to the total nitrogen excreted amounts to over 30% in intoxicated animals.

2. The excretion of sulphur is always increased after the phosphorus injection. While in case of severe intoxication the excretion of total sulphur is not more than normal or rather is decreased a little, the excretion of neutral sulphur is very much increased.

3. The oxygen consumption of phosphorus poisoned animals is decreased, the degree of which coincides fairly well with the histological change in the liver, but has no relation to that of the kidney.

The change in the oxidation quotient of the urine is in proportion to the severity of the intoxication. The mode of changes in the urine of phosphorus intoxicated animals can be understood when viewed together with the changes in the liver and the kidney. The liver is first attacked by the phosphorus and in the lapse of time after the phosphorus injection the damages in the function of liver proceed constantly, while the interference in the function of the kidney comes into play more slowly. The great decrease in the nitrogen excretion in the urine in case of severe intoxication is an indication of the damage in the kidney and coincides with histological findings. The results in the blood analysis shows also a great stagnation of non-protein nitrogen and above all that

of urea nitrogen in this stadium of poisoning. The nature and amount of nitrogenous and sulphur compounds excreted in the urine is explainable as the results of the autolytic process in the liver and the disability of the kidney.

IV. THE CHANGE IN THE LIVER.

I. Content of water, non-protein nitrogen, and fatty acid.

The liver increases in size and weight as the intoxication proceeds. The colour changes to a yellow gray at last. The results of chemical analyses made on 37 livers is given in table IX in its summarized form. The changes are compared according to the histological appearance, and content of water, non-protein nitrogen and fatty acid.

As will be clear from the table, unique changes in the liver are the increases in the content of water, non-protein nitrogen, and fatty acid. The solid substance decreases naturally with the increase of water content, and the amount of total nitrogen is proportionally less, when fatty acid substances occupy much larger space than in the normal condition. It is therefore not sound to try to find any relation between the fatty acid content and the amount of total nitrogen. In the following any relationship which seemed to us to exist between some constituents of the intoxicated liver is considered:

1. The grade of fatty degeneration which is revealed by the appearance of Sudan III dyeing and necrobiosis is accompanied always with an increase in size and in the total solid mass of the liver. The content of residual nitrogen and fatty acid goes also parallel with them.

2. Increase in water content is paralleled by the increase of non-protein nitrogen both in absolute amount and in comparison with total nitrogen.

3. With the increase in fatty acid the amount of unsaponifiable substances is also increased. The ratio of unsaponifiable sub-

TABLE IX.

Condition of classification (in liver)	Weight of liver per kilo body weight	per 100 parts of fresh liver		per 100 parts of Solid				per 1 gm. of N		
		Solid	Water	Total N	Non- protein N	Fatty acid	Unsapo- nifiable substance	Non- protein N	Fatty acid	Un- sapo- nifiable sub- stances
Normal	mg. 22.6	30.66 (13.83)*	69.34	10.73 (1.386)	0.770 (0.102)	9.936 (1.318)	0.527 (0.069)	mg. 72	mg. 0.93	mg. 53
Mild	35.2	24.71 (13.88)	75.29	10.06 (1.682)	1.073 (0.160)	12.829 (1.929)	1.002 (0.160)	106	1.19	100
Moderately severe	38.8	22.85 (16.63)	77.15	10.56 (1.615)	1.114 (0.147)	19.103 (3.295)	1.230 (0.230)	101	1.81	116
Severe	44.1	20.49 (18.34)	79.08	9.49 (1.862)	1.272 (0.279)	21.181 (3.616)	1.040 (0.177)	134	2.23	101
less than 76%	35.5	26.51 (18.34)	73.49	9.44 (1.743)	0.961 (0.179)	15.250 (2.876)	0.892 (0.176)	102	1.62	94
76-80%	35.9	22.38 (17.85)	77.62	9.52 (1.627)	1.142 (0.183)	18.145 (2.942)	1.337 (0.196)	120	1.91	143
more than 80%	46.7	17.31 (16.09)	82.69	10.44 (1.861)	1.469 (0.282)	18.729 (3.283)	1.009 (0.187)	141	1.79	97
less than 1%	37.6	24.04 (17.98)	75.96	9.38 (1.687)	0.853 (0.153)	16.264 (2.924)	1.064 (0.191)	93	1.79	121
1-1.5%	35.9	23.27 (16.49)	76.73	10.43 (1.749)	1.130 (0.189)	18.004 (2.978)	1.251 (0.210)	112	1.84	129
more than 1.5%	45.1	20.85 (16.56)	79.15	10.20 (1.968)	1.774 (0.333)	18.679 (3.833)	0.893 (0.152)	173	1.83	88
less than 15%	28.6	23.45 (16.79)	76.55	10.18 (1.163)	1.074 (0.188)	10.207 (1.858)	0.868 (0.156)	106	1.04	85
15-20%	41.3	22.99 (18.19)	77.01	9.76 (1.777)	1.109 (0.202)	17.355 (3.156)	1.135 (0.206)	122	1.88	118
more than 20%	42.6	20.77 (16.43)	79.23	9.06 (1.751)	1.092 (0.234)	27.687 (4.532)	1.595 (0.225)	119	3.08	176

* All numbers placed in brackets denote the amount of substance contained in a whole liver.

stances to the total fatty acid decreases however when the amount of fatty acid is greatly augmented.

Summarizing these findings it may be concluded that when the intoxication in the liver proceeds an increase of non-protein nitrogen accompanied by the hydropic condition of the tissue is observed. Parallel with this goes always the accumulation of fatty substance in the liver which according to the degree of increase may sometimes obscure other existing relationships.

What is constantly seen with the increase of fatty acid is the decrease in the ratio of unsaponifiable substance to total fatty acid.

II. *Content of cholesterol, cholesterol ester and lecithin.*

The latter fact lead us to investigate the distribution of the fatty constituents in the liver with the method of Bloor as described. I analyzed the liver of a normal and a poisoned animal for these fatty constituents and the results are given in table X.

As the table indicates, the amount of cholesterol is always considerably increased in poisoned animals, while that of lecithin shows a slight increase. The ratio C/L is therefore increased quite a good deal.

The ratio C/F decreases with the severity of intoxication, as the increase in total fatty acid is larger than that of cholesterol. The ratio of free and combined cholesterol was then determined in very severely poisoned animals.

The result is shown in table XI.

The table indicates that although both free and ester cholesterols are increased in the case of phosphorus intoxication the increase of ester cholesterol is far more than that of free cholesterol, so that the ratio of free to ester cholesterol is much less in the intoxicated liver than that of a normal animal.

TABLE X.

Rabbit	Weight		Weight of liver		Weight of liver per kilo body weight		per 100 parts of fresh liver		per 100 parts of solid						per 1 gm. of Total N				Cholesterol	Leicithin	Total fatty acid	Hours after phosphorus injection	Fatty degeneration of liver
	No.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	Solid	Water	Total N	Non-protein N	Total fatty acid	Leicithin	Cholesterol	Total	Fatty acid	Leicithin	Cholesterol	Non-protein N	Cholesterol	Leicithin	Total fatty acid		
Average	83	3000	78.5	26.2	26.2	26.2	28.84	71.16	11.07	0.566	10.263	9.412	1.334	0.93	0.85	0.12	0.05	0.13	0.14	0.92	0.92	0.75	normal liver
	81	2350	62.0	26.4	26.4	26.4	29.80	70.20	10.32	0.600	9.804	7.290	0.930	0.95	0.71	0.09	0.06	0.10	0.13	0.74	0.74		
	85	2500	82.0	32.8	32.8	32.8	28.40	71.60	10.31	0.560	9.839	7.403	0.917	0.96	0.72	0.10	0.05	0.09	0.11	0.75	0.75		
	86	2000	64.0	32.0	32.0	32.0	27.11	72.19	10.98	0.581	11.252	6.460	1.065	1.02	0.59	0.10	0.05	0.09	0.16	0.57	0.57		
	Average		71.6	29.4	29.4	29.4	28.54	71.46	10.67	0.577	10.293	7.641	1.064	0.97	0.72	0.10	0.05	0.10	0.14	0.75	0.75		
Average	87	1750	52.0	29.7	29.7	29.7	24.49	75.51	11.56	0.873	12.634	5.579	1.518	1.09	0.48	0.13	0.08	0.12	0.27	0.44	0.44	24	moderately severe
	88	2350	72.0	30.6	30.6	30.6	22.19	77.81	13.25	0.936	19.517	10.367	1.720	1.47	0.78	0.13	0.07	0.09	0.17	0.53	0.53	24	
	89	2060	85.5	41.5	41.5	41.5	26.04	73.96	9.92	0.783	18.226	6.184	1.636	1.84	0.62	0.16	0.08	0.09	0.26	0.34	0.34	24	
	90	2100	62.5	29.8	29.8	29.8	25.60	74.40	11.37	0.770	19.207	9.685	1.695	1.66	0.84	0.15	0.07	0.09	0.18	0.50	0.50	24	
	91	2130	90.0	42.3	42.3	42.3	24.06	75.94	10.20	0.906	17.324	8.574	1.343	1.70	0.81	0.13	0.09	0.08	0.16	0.49	0.49	36	
	92	2240	71.5	31.9	31.9	31.9	24.06	75.94	11.29	0.711	17.257	8.698	1.528	1.54	0.77	0.14	0.06	0.09	0.18	0.50	0.50	36	
	Average		72.3	34.3	34.3	34.3	24.40	75.60	11.30	0.830	17.361	8.181	1.573	1.55	0.72	0.14	0.07	0.09	0.20	0.47	0.47		
Average	93	2030	91.5	45.1	45.1	45.1	20.90	79.10	9.51	1.112	26.822	9.634	2.341	2.82	1.01	0.26	0.12	0.09	0.24	0.36	0.36	46	severe
	94	2080	65.5	31.5	31.5	31.5	24.11	75.89	9.93	0.835	20.785	6.033	1.469	2.08	0.61	0.15	0.08	0.07	0.24	0.29	0.29	33	
	95	2000	101.5	50.8	50.8	50.8	21.15	79.85	7.86	1.085	29.622	13.929	2.393	3.78	1.77	0.30	0.14	0.08	0.17	0.47	0.47	50	
	96	2500	118.0	47.2	47.2	47.2	23.36	76.64	7.86	1.223	26.251	6.926	2.258	3.34	0.88	0.30	0.16	0.09	0.33	0.26	0.26	48	
	97	1800	55.5	30.8	30.8	30.8	24.67	75.33	11.31	0.748	30.615	7.469	2.458	2.71	0.66	0.22	0.07	0.08	0.33	0.24	0.24	24	
	Average		86.4	41.1	41.1	41.1	22.64	77.36	9.29	1.001	26.819	8.798	2.184	2.95	0.99	0.25	0.11	0.08	0.26	0.32	0.32		

TABLE XI.

Rabbit		Liver		Total cholesterol		Free cholesterol		Cholesterol esters		Per cent of basis of Total cholesterol	
No.	Weight	Weight	Solid	%	gm.	%	gm.	%	gm.	F. Ch.	Chol. E.
Normal animal											
118	2350	62.0	27.82	0.983	0.170	0.844	0.146	0.139	0.024	85.86	14.17
119	3000	70.0	24.09	1.101	0.190	0.945	0.163	0.156	0.027	85.83	14.17
120	2400	68.0	23.62	0.834	0.134	0.707	0.114	0.127	0.020	84.77	15.23
Average	2583	66.7	25.38	0.972	0.165	0.831	0.141	0.141	0.024	85.49	14.51
Intoxicated animal											
114	2440	93.0	19.54	1.592	0.290	1.076	0.196	0.516	0.094	67.59	32.41
115	2220	103.0	17.36	1.622	0.290	1.089	0.195	0.533	0.095	67.14	32.86
116	2550	170.0	16.18	1.374	0.378	1.135	0.312	0.239	0.066	82.61	17.39
117	2250	122.0	16.58	1.582	0.320	1.366	0.276	0.216	0.014	86.35	13.65
Average	2365	122.0	17.42	1.543	0.324	1.167	0.245	0.376	0.079	75.92	24.08

TABLE XII.

Date 1927	Rabbit No.	Water	Total N	Non-protein N	Poly-peptide N	Poly-peptide N Non-protein N	Non-protein N Total N	Poly-peptide N Total N	After the injection of P	Degree of intoxication
March		%	gm.	gm.	gm.	%	%	%	hrs.	
1	56	70.87	12.26	0.480	0.141	29.38	3.92	1.15		normal (control)
1	57	69.92	10.57	0.517	0.136	26.31	4.89	1.29		
2	58	71.32	11.47	0.495	0.155	31.31	4.32	1.35		
2	59	72.37	11.18	0.504	0.149	29.56	4.51	1.33		
3	60	71.46	11.53	0.508	0.151	29.72	4.41	1.31		
Average		71.19	11.40	0.501	0.146	29.14	4.39	1.29		
14	68	75.16	10.35	0.472	0.162	34.32	4.56	1.57	41	mild
21	72	75.07	10.53	0.489	0.152	31.08	4.63	1.46	34	
12	67	75.79	11.24	0.638	0.2073	11.44	5.68	0.65	36	
9	76	75.33	11.31	0.504	0.244	48.41	4.46	2.15	24	
10	65	74.40	11.57	0.563	0.207	36.77	4.87	1.79	24	
8	64	73.96	9.92	0.556	0.227	40.83	5.64	2.25	24	
Average		74.95	10.82	0.537	0.179	33.33	4.96	1.66		
19	71	77.72	11.11	0.691	0.139	20.12	6.92	0.55	63	Moderately severe
4	61	75.51	11.56	0.640	0.233	36.41	5.54	2.01	24	
7	63	77.81	13.25	0.690	0.246	35.65	4.21	2.85	24	
30	82	78.41	10.41	0.754	0.210	27.85	7.24	2.02	46	
28	77	77.44	10.33	0.802	0.171	21.32	7.76	1.66	48	
24	74	79.85	7.86	0.870	0.215	24.71	11.07	2.73	50	
23	73	78.05	6.57	0.900	0.192	21.33	13.70	2.92	38	
Average		77.83	10.16	0.764	0.201	26.31	7.52	1.98		
5	62	78.26	10.90	0.694	0.409	53.93	6.37	3.75	24	severe
15	69	79.10	9.51	0.851	0.261	30.67	8.95	2.74	46	
31	80	80.47	10.88	0.928	0.253	27.26	8.53	2.34	46	
24	75	76.64	7.86	0.868	0.355	40.90	11.04	4.54	48	
28	78	78.36	9.05	0.938	0.325	34.56	10.34	3.62	21	
31	81	76.74	11.94	1.067	0.214	20.06	8.94	1.79	48	
28	79	80.61	8.89	1.026	0.273	16.61	11.54	3.03	21	
Average		78.60	9.86	0.910	0.299	32.86	9.23	3.03		

III. Content of polypeptide nitrogen and total residual nitrogen.

In table IX the amount of nitrogen not precipitable by metaphosphoric acid was denoted as non-protein nitrogen. To get clearer idea in regard to the change in the amount of polypeptide nitrogen, experiments were undertaken to follow the change in the amount of nitrogen not precipitable by trichloroacetic acid but precipitable by phosphotungstic acid.

The amount of this nitrogen denoted as polypeptide nitrogen, and that of the phosphotungstic acid precipitable nitrogen of the differently affected animals are given in table XII.

As can be seen from the table, both of the nitrogens increase with the degree of intoxication. The ratio of these nitrogen remains however almost the same.

DISCUSSION.

We saw in preceding paragraphs that the main changes in the liver in phosphorus intoxication are. 1. The increase of non-protein-nitrogen and of water content. 2. The increase of fat content. 3. The increase of cholesterol content. These changes can be easily explained from the autolytic process and non-functioning of fat metabolism in the liver.

1. The increase of non-protein nitrogen and water content is mainly due to the autolytic process in the liver. The intoxicated liver cells naturally undergo prompt autolytic decomposition and protein-stuffs contained in the cell disintegrate into many smaller molecules, inducing thus the increase of osmotic pressure within the cell and consequently the increase in the water content. As is seen above the amount of polypeptide and that of less complicated nitrogenous compounds are increased in almost the same mutual proportion.

2. The increase in the fat content in the liver is to be considered as due to the stagnation of fat molecules, which ordinarily

come into the liver cell, and are worked out there to more easily available forms and leave the cell to be carried into other tissues for oxidation. This transformation of the fat molecule in the liver is retarded by intoxication.

3. The same reasoning may be applied to the increase in cholesterol and cholesterol ester in the liver. In the normal state the liver cell transforms the cholesterol ester into cholesterol and excretes it into bile. In the intoxicated liver however the process is inhibited and cholesterol and the incoming cholesterol ester is stagnated within the cell.

V.. THE CHANGE IN THE BLOOD.

I. The content of non-protein nitrogen and fatty substances.

The change in the amount of total nitrogen, non-protein nitrogen, total fatty acid, cholesterol, lecithin and hemoglobin was studied with different samples of blood, which were drawn from the animal at different times after the injection of phosphorus. The number of animals used for this study was 45 in all, and the range of time after the injection varied between 8-48 hours. The result of the analyses, which gives the average value for different kinds of condition, was viewed from different angles, that is, from the microscopical change in the liver, the water content of the liver, the non-protein nitrogen and the increase of the fatty acid in the liver and is given in table XIII in summarised form.

It will be seen from this table that the most significant change in the blood is the increase in the amount of non-protein nitrogen, while the content of fatty acid and its allied substances remained rather within the normal range. A slight decrease of fatty acid value, however, seems to accompany the liver degeneration, which is reckoned by the increase of non-protein nitrogen content and histological findings in the liver. These blood constituents are to be considered as a result of autolysis in liver. The fat

TABLE XIII.

The change in the blood composition in relation to the change in the liver and the percentage of increase in the non-protein nitrogen in the blood.

	per 100 cc. of blood					Total fatty acid	Lecithin	Cholesterol	Lecithin	Cholesterol	Total fatty acid	Non-protein N	mg. protein N	gm. fatty acid	gm. cholesterol	gm. lecithin	Hemoglobin
	Total N	mg. N	gm. fatty acid	gm. cholesterol	gm. lecithin												
Fatty degeneration of liver	2.73	58.7	0.29	0.12	0.25	1.17	2.28	2.08	74	80	85	71	84	82	80	72	84
	2.94	91.5	0.29	0.10	0.23	1.21	2.28	2.32	74	80	85	71	84	82	80	72	84
	2.95	120.7	0.28	0.10	0.24	1.19	2.32	2.41	71	84	82	80	72	84	80	72	84
Water content of liver	2.79	80.1	0.31	0.10	0.23	1.32	2.22	2.22	80	72	84	71	84	82	80	72	84
	2.88	84.8	0.28	0.10	0.25	1.13	2.11	2.11	80	72	84	71	84	82	80	72	84
	2.89	101.1	0.29	0.10	0.24	1.12	2.41	2.41	80	72	84	71	84	82	80	72	84
Non-protein nitrogen in liver	2.96	83.9	0.32	0.11	0.24	1.32	2.22	2.22	80	72	84	71	84	82	80	72	84
	2.52	65.7	0.27	0.12	0.24	1.10	2.18	2.18	80	72	84	71	84	82	80	72	84
	2.96	111.8	0.26	0.10	0.23	1.09	2.33	2.33	80	72	84	71	84	82	80	72	84
Fatty acid in liver	2.85	66.3	0.30	0.11	0.25	1.19	2.28	2.28	77	73	86	77	73	86	77	73	86
	2.68	114.4	0.25	0.09	0.23	1.09	2.48	2.48	77	73	86	77	73	86	77	73	86
	2.96	103.2	0.29	0.11	0.23	1.26	2.02	2.02	77	73	86	77	73	86	77	73	86
Percentage of increase of non-protein nitrogen in blood	2.87	50.7	0.32	0.11	0.26	1.25	2.32	2.32	74	83	81	74	83	81	74	83	81
	2.84	78.0	0.27	0.11	0.26	1.13	2.21	2.21	74	83	81	74	83	81	74	83	81
	2.84	117.5	0.27	0.11	0.23	1.15	2.23	2.23	74	83	81	74	83	81	74	83	81

transport into the liver by the blood stream is not increased at all, the fat infiltration being caused by the stagnation of incoming fatty substances.

II. *The content of ethereal and inorganic sulphate.*

As I had observed in the examination of the urine the fact, that while mild cases of intoxication the ratio of ethereal to inorganic sulphate increases, in severe cases this ratio clearly decreases, indicating that this ethereal sulphate goes with more difficulty into the urine after intoxication. The proportion of inorganic and ethereal sulphate in the blood was therefore examined. The result is shown in table XIV.

TABLE XIV.

Rabbit		Mg of S per 100 cc. of blood			Per cent of S on basis of total sulfates		Non protein nitrogen (per 100 cc. of blood)
	No. of group	Total sulfates	Inorg. sulfates	Ethereal sulfates	Inorg. S.	Ether. S.	
Normal	1	3.71	2.75	0.96	74	26	mg. 49.0
	2	4.18	3.08	1.10	74	26	50.2
	3	3.96	2.85	1.10	72	28	56.0
	Average	3.95	2.89	1.06	73	27	51.7
Intoxicated	4	4.81	2.40	2.41	50	50	90.6
	5	8.24	5.04	3.20	61	39	55.4
	6	10.72	4.26	6.46	40	60	153.2
	Average	7.92	3.90	4.02	49	51	99.7
	7*	19.24	7.42	11.78	39	61	165.2

* Blood of V. cava inf. thoratica.

As the table shows, the ethereal sulphate increases much more than the inorganic sulphate. These cases were all severe ones and the excretion of ethereal sulphate seemed more difficult than usual due to the change in the kidney.

III. The amount of polypeptide nitrogen and total residual nitrogen.

In this section determination of polypeptide nitrogen and total residual nitrogen in the blood was performed. We did this because we thought the comparison of the amount of polypeptide nitrogen and more or less complicated nitrogen as urea and allied substances might reveal the functional condition of kidney. In table XV is given the result of such determinations made on the animal at different hours after the phosphorus injection.

From the table it can be seen that so long as the function of kidney is not much interfered with, the ratio of polypeptide nitrogen and total non-protein nitrogen in the blood does not change much, no matter how the autolytic change in liver may vary.

In nearly all of the animals one day and a half after injection the ratio remains almost the same as in the normal condition (19-20%). After the lapse of 48 hours, however, the damage in the kidney becomes large and the excretion of urea into urin is also much interfered with, so that in this severe case the ratio becomes very much lowered (12.8).

IV. The dysdesamination coefficient.

I examined next the dysdesamination coefficient as it proposed by Cristol, Puech and Trivas (1927). The animals were fed on a definite ration consisting mainly of Okara and the feeding was cut off during 24 hours previous to blood sampling. The results are shown in table XVII.

As is clear from the table, although all of the urea nitrogen, polypeptide nitrogen and amino acid nitrogen were increased and the dysdesamination coefficient was also increased, there are still

TABLE XV.

The comparison of polypeptide nitrogen with non-protein nitrogen in different degrees of phosphorus intoxication.

Date 1927	Rabbit No.	Water	Total N	Non-protein N	Polypeptide N	Polypeptide N Non-protein N	After the injection	Degree of intoxication
Normal animal								
1	56	%	gm.	mg.	mg.	%	hrs.	
1	57	79.32	3.185	39.2	7.5	19.13		
2	58	79.15	3.024	33.6	6.6	19.64		
2	59	77.31	3.430	33.6	7.5	22.32		
3	60	80.02	3.100	37.4	5.5	14.71		
		80.56	2.884	35.5	7.5	21.13		
Average		79.27	3.125	35.9	6.9	19.22		
Intoxicated animal								
4	61	78.97	3.143	37.4	9.3	24.87	24	mild
5	62	78.80	3.360	37.4	9.3	24.87	24	
8	64	79.05	3.115	37.4	9.3	24.87	24	
10	65	80.92	3.193	37.4	9.3	24.87	24	
14	68	77.77	3.683	41.1	5.6	13.63	41	
12	67	80.50	2.892	43.0	7.4	17.21	36	
11	66	81.45	2.723	46.7	5.5	11.78	36	
Average		79.64	3.158	40.1	8.0	19.95		
7	63	78.60	2.993	50.4	7.5	14.88	24	moderately severe
28	78	78.37	3.278	59.8	16.8	28.09	46	
28	79	82.94	2.543	65.4	14.9	22.78	21	
24	74	78.41	3.292	72.5	10.4	14.34	50	
21	72	81.88	2.821	85.9	22.4	26.08	34	
15	70	77.27	3.577	89.7	16.8	18.73	33	
9	76	78.83	3.334	93.4	18.7	20.02	24	
Average		79.39	3.120	73.9	15.4	20.84		
28	77	78.67	3.264	100.9	18.7	18.53	48	severe
15	69	77.59	3.591	108.3	16.9	15.60	46	
30	82	79.61	3.187	115.8	11.2	9.67	46	
24	75	78.80	3.474	123.2	15.0	12.18	48	
24	80	82.08	2.665	168.1	13.1	7.79	46	
Average		79.35	3.236	123.3	15.8	12.81		

TABLE XVI.

Rabbit No.	Weight	Mg. per 100 cc. of Plasma			Dysdesamina- tion coefficient	Hours after phosphorus injection	Microscopical change	
		Urea N	Poly-peptide N	Amino-acid N			Liver	Kidney
Normal animal								
121	gm. 2070	21.0	5.1	9.4	40.8	normal	normal	
122	2420	18.7	5.3	8.5	42.5			
123	2160	21.7	4.7	10.9	41.8			
124	2110	21.0	6.7	8.6	42.1			
125	1900	21.7	4.6	9.6	39.6			
126	2460	19.6	5.3	10.0	43.8			
Average	2187	20.6	5.3	9.5	41.8			
Intoxicated animal								
127	2050	34.5	26.0	43.0	66.9	36	very severe	mild
128	2120	37.5	21.0	33.1	59.1	28		
129	2290	44.3	39.0	37.6	61.9	28		
130	2050	41.1	63.0	32.9	70.0	22		
Average	2128	39.4	37.3	34.4	64.5			
131	2030	48.7	28.5	28.8	54.1	38	very severe	severe
132	2170	40.6	24.5	25.2	55.0	40		
133	2150	41.5	24.5	38.7	60.4	58		
134	2150	42.6	28.0	32.4	56.7	34		
Average	2125	43.4	26.3	31.3	56.6			
135	2520	61.1	36.8	27.6	51.3	38	severe	severe
136	2190	60.7	28.0	39.6	52.9	46		
137	2000	24.7	11.5	15.9	52.6	24		
Average	2237	48.8	25.4	27.7	52.3			

fluctuations in all of these numbers; that these variations are due to the mutual state of functional damage of liver and kidney is shown by the histological examination of these organs.

According to the degree of histological change the examined cases are classified as in table XVI. As is clear from the table, the dysdesamination coefficient is the highest when the function of the liver is severely damaged, inducing the increase of polypeptide and amino acid nitrogen, while the kidney is not damaged much to affect the urea excretion. The change in the dysdesamination coefficient is smaller when the damage of the function of liver is mild, while the kidney function is rather severely interfered with.

In this case the increase in the polypeptide and the amino acid nitrogen is not very large and the urea contents remained pretty high because of the difficulty of excretion by the kidney. The dysdesamination coefficient of a phosphorus poisoned animal behaves just according to the functional changes in the liver and the kidney.

Discussion.

The analysis of the blood in the phosphorus intoxicated animal clearly reveals the fact, that the products of autolysis in liver cells are flooded into blood stream, while the content of fatty substances is no more than the normal value.

The fat infiltration in liver or kidney is only caused by the inability of the cells of these organs to manipulate the incoming fatty substances.

The figures in ethereal and inorganic sulphate indicate, when considered with findings in the urine, that the excretion of the ethereal sulphate through the kidney is more highly affected by the phosphorus poisoning. When the degree of intoxication is advanced the excretion of less complicated protein metabolic substance through the kidney becomes hardend, while the amount of polypeptide nitrogen in the blood is rather lessend. As the result the ratio of polypeptide nitrogen to the residual nitrogen goes below the normal value.

This is an indication that the damage of the kidney is advanced and the life of the animal is endangered. The dysdesamination coefficient falls also in these cases.

VI. *The morphological change in liver and kidney.*

A group of intoxicated animals was killed at a certain intervals after the injection of phosphorus and the liver and kidney were examined microscopically. The microscopical feature of the examined organs is summarized in table XVII.

In the table +++ indicates that large fat droplets occupy the cells, while + means the existence of some minute droplets.

Figures between these two extremes are indicated by ++.

Summarized, the following generalization may be drawn:

1. By intoxication with phosphorus fatty degeneration is very manifest in the liver, while the kidney is not severely affected.

2. The degeneration begins to appear first in the interstitium of the liver, while the change in *parenchyma* comes later.

The degree of degeneration in the interstitium is however quite limited, even when the change in the *parenchyma* reaches maximum.

3. In the kidney the tubuli contorti are most frequently affected, followed by the tubuli recti, while the degeneration of the glomeruli is very rare.

4. Generally the degree of degeneration is proportional to the length of time after the injection of the phosphorus.

The exception is however not rare.

CONCLUSION.

1. When rabbits are intoxicated by a phosphorus injection the liver is attacked first and after a little lapse of time the function of the kidney becomes greatly interfered with.

2. Parallel with the degree of intoxication both the water content and the amount of non-protein nitrogen of the liver increase, indicating there is an autolytic process within the liver going on.

TABLE XVII.

The microscopical feature of fatty degenerated liver and kidney of rabbit poisoned with phosphorus.

Fatty degeneration	No. of Rabbit	After injection of phosphorus	Liver		Kidney			Albuminuria
			Parenchyma cells	Interstitial cells	Glomeruli	Tubuli contorti	Tubuli recti	
Mild	4	hrs. 3		+				
	5	3				+		
	6	16		+				
	7	16		+				
	8	16						+
	11	8	+	+				
	12	24	+	+				+
	13	24	+	+				
	15	21			+			+
	16	48	+	+				
	20	32						
	36	21	+	+				
	39	12	+	+			+	
Moderately severe	1	24	++	+	+	+	+	+
	18	32						
	19	32						
	34	25	++	++		+		
	35	48	++	++				+
	37	34	++	++				
	40	36	++	++		+		
Severe	2	48	++++	+		+		+
	3	51	++++	++		+		+
	9	35	++++	+		+	+	+
	10	40	++++	+		+		+
	14	40	++++	+			+	+
	17	48	++++	+				+
	21	48	++++	+	+	+++	+	+
	22	34	++++	+		++++	++++	+
	23	35	++++			++++	++++	+
	30	24	++++	+		++++	++	+
	31	24	++++	++++		++	+	
	32	46	++++	++++		+		+
	33	46	++++	++++	+	+	+	+
	38	24	++++	++++		++	+	+

3. The content of fat and cholesterol in the liver amounts to a high percentage, owing to the stagnation of these substances coming into the liver, which could not be worked out as usual.

4. The products of autolysis in the liver flood out into the blood stream, while the content of the fat and fatty substances in the blood remains within normal values.

5. When the kidney is severely affected the amount of non protein nitrogen in the blood increases to a high value, while the amount of sulphate, especially that of ethereal sulphates in the blood, increases earlier and in a larger degree.

6. The excretion of nitrogen into the urine is greatly decreased whenever the kidney is damaged to a certain extent. The percentage of urea nitrogen to the total nitrogen is always decreased indicating the functional damage of urea formation in the liver.

7. Both the absolute amount of oxygen consumption of the animal and the degree of dysoxidizability examined by Vakatsky's oxygen method decrease in the case of phosphorus intoxication. It is suggested from the result, that the qualitative side of oxidation is more highly damaged than the quantitative one.

REFERENCES.

- Benedict, F. G., (1909): *Journ. of biol. chem.*, **6**, 363.
Bickel, (1925): *Biochem. Ztschr.*, **166**, 251.
Bloor, W., (1915): *Journ. of biol. chem.*, **22**, 133, 145; **23**, 317.
Bloor, W., (1918): *Journ. of biol. chem.*, **36**, 33.
Cristol, P., A. Puech et Triva, (1927): *Cpt. rend. des séances de la soc. de biol.*, **96**, 676.
Denis, W. and L. Reed, (1926): *Journ. of biol. chem.*, **71**, 191.
Folin, O., (1922): *Journ. of biol. chem.*, **51**, 377.
Krogh, A., Abderhalden's *Handbuch der biol. Arbeitsmethoden* (1927), Abt. IV, Teil 10, 937.
Kumagawa, M. u. Suto, K., (1908): *Biochem. Ztschr.*, **8**, 212.
Morita, C., (1924): *Journ. of biochem.*, **4**, 73.
Müller, H., (1927): *Biochem. Ztschr.*, **186**, 451.
Onizawa, J., (1928): *Journ. of biochem.*, **10**, 45.
van Slyke, and Cullen, (1914): *Journ. of biol. chem.*, **19**, 211.

DIE HEMMENDE WIRKUNG DER SPLANCHNICOTOMIE AUF DIE ATROPINGLYKÄMIE.

Von

SHIN-ICHI KAWASHIMA UND YOSHIO IWANAGA.

(Aus der medizinischen Klinik von Prof. Dr. Inada,
Kaiserliche Universität zu Tokio.)

(Eingegangen am 28. Juli 1928.)

Über das Verhalten des Blutzuckers unter Einwirkung einer kleinen Gabe von Atropin sind die Angaben von vielen Autoren noch nicht einig. Jedoch wurde die Hyperglykämie bei grösseren Atropindosen von allen Seiten übereinstimmend bestätigt. In unserer Klinik wies Shim (1925) am Diabetiker nach, dass die Zuckerausscheidungsschwelle durch Atropin sich sehr häufig erhöht, was auch von Eda (1927) am Kaninchen bestätigt wurde. Die Frage, wie diese Atropinglykämie zustande kommt, wurde bis heute wenig untersucht. McGuigan will diese Erscheinung auf die Aufregung des Versuchstieres zurückführen. Es scheint aber die herrschende Meinung zu sein, dass die Atropinglykämie durch zentrale Reizung hervorgerufen wird (S. Pollak), ohne dass ein experimenteller Beweis dafür, wenigstens unseres Wissens, geliefert worden ist. Nach zahlreichen Untersuchungen über die Zuckerausscheidungsschwelle in unserer Klinik ist es höchst wahrscheinlich, dass der Schwellenwert bei der sympathischen Erregung sich erhöht. So liegt der Gedanke nahe, ob nicht die Atropinglykämie auch eine Art von sympathischer Hyperglykämie sei. Wenn diese Glykämie von zentraler Natur ist, wie die bisherigen Autoren glaubten, so kann man erwarten, dass Atropinglykämie bei Splanchnicotomie ausbleiben muss. Um diese Frage zu entscheiden, haben wir auf Veranlassung und unter Leitung von Prof. R. Inada und K. Sakaguchi den Einfluss der Splanchnicotomie auf Atropinglykämie untersucht.

Bei unseren Untersuchungen gingen wir so vor, dass wir als

Kontrollversuche an Kaninchen, die etwa 15 Stunden lang gefastet hatten und so viel 0.1% Atropinlösung subcutan injicierten, dass wir eine leichte Blutzuckersteigerung ohne starke Vergiftungserscheinung erzielen konnten. Dann wiederholten wir die Versuche durch Injection mit gleichgrossen Atropindosen, nachdem die Tiere sich vollständig von der beiderseitigen Splanchnicotomie erholten. Die einzelnen Daten sind in folgenden Tabellen wiedergegeben.

TABELLE I.
Kontrollversuche.

Kaninchen		Atropin	Blutzucker %°						Prozentualer Zucker- anstieg
No.	kg	mg	Vor	½ h	1 h	1½ h	2 h	3 h	
1	2.5	3.0	129	168	148	133	122	113	14.7 %
2	2.4	3.0	120	126	135	128	127	116	12.5 %
3	3.0	3.0	100	95	115	109	111	91	15.0 %
4	2.5	2.5	95	95	107	112	105	91	17.9 %
5	3.0	3.0	79	95	98	80	80	79	24.0 %

TABELLE II.
Versuche nach der Splanchnicotomie.

Kaninchen		Atropin	Blutzucker %°						Prozentualer Zucker- anstieg
No.	kg	mg	Vor	1½ h	1 h	½ h	2 h	3 h	
1	2.05	3.0	95	93	95	98	96	91	5.4 %
2	1.95	3.0	95	95	92	100	91	91	5.3 %
3	1.65	2.5	95	93	100	98	101	100	5.3 %
4	2.20	2.7	107	107	108	109	109	109	1.9 %
5	2.20	2.8	121	122	126	120	119	119	4.1 %
6	2.20	2.9	145	144	147	146	148	146	2.1 %

Wie die Tabellen zeigen, wurde ein Blutzuckeranstieg durch

Atropin bei allen Kontrollversuchen mehr oder minder deutlich gefunden, während er nach der beiderseitigen Splanchnicotomie ganz unbedeutend war. Dieser Befund beweist, dass Atropinglykämie durch zentrale Erregung des Sympathicus zustande kommt.

SCHLUSS.

Atropinglykämie wird durch beiderseitige Splanchnicotomie deutlich gehemmt, was darauf hindeutet, dass diese Hyperglykämie durch zentrale Erregung des Sympathicus zustande kommt.

LITERATUR.

- Eda, G. (1927): Einfluss des Atropins und Scopolamins auf die Zuckerausscheidungsschwelle. Diese Zeitschr. **7**, 345.
Pollak, L. (1923): Physiologie u. Pathologie der Blutzuckerregulation. *Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk.* **28**, 398.
Shim, H. S. (1925): Einfluss des Atropins u. des Pilocarpins auf die Zuckerausscheidungsschwelle. Diese Z. **5**, 333.

ÜBER DEN EINFLUSS DES ERGOTAMINS AUF DEN BLUTZUCKERGEHALT.

Von

GENICHIRO EDA.

(Aus der medizinischen Klinik von Prof. Dr. Ryokichi Inada,
Kaiserliche Universität zu Tokyo.)

(Eingegangen am 28. Juli 1928.)

Das Ergotamin wurde in neuester Zeit als ein lähmendes Gift der sympathischen Nervenendigungen von vielen Seiten zur Erläuterung des Mechanismus verschiedener Hyperglykämien herangezogen. Nach übereinstimmenden Angaben steht heute so weit fest, dass sympathische Hyperglykämie, wie die durch Adrenalin u. a., unter der Wirkung des Ergotamins ausbleibt. Das Alkaloid wirkt aber auf die durch parasympathische Gifte verursachte Hyperglykämie ebenso hemmend, aus welchem Grunde behauptet wird, dass diese Hyperglykämie eigentlich sympathischer Natur ist. Hierüber habe ich (1928) vor kurzem einige Versuche veröffentlicht.

Alimentäre Hyperglykämie scheint auch durch Ergotamin häufig gehemmt zu werden. Hetényi und Pogany (1926) haben an zwei Hyperthyreatikern festgestellt, dass ein ausgesprochener alimentärer Blutzuckeranstieg bei vorangehender Ergotamininjektion ganz ausbleibt. Sie schlossen daraus, dass ihre Versuche für die seit neuerer Zeit viel genannte Reiztheorie der alimentären Hyperglykämie sprechen, nach welcher das peroral zugeführte Kohlenhydrat als Reiz wirkt, indem dieser Reiz im Endergebnis eine Erregung der sympathischen Endapparate der Leber hervorruft, die dann ihrerseits die Mobilisierung des Leberglykogens bewirkt. Grunke (1926) hat an sechs Nichtdiabetikern und an zwei Zuckerkranken eine depressorische Wirkung des Ergotamins auf eine alimentäre Hyperglykämie beobachtet und angenommen, dass eine Abhängigkeit der letzteren vom vegetativen

Nervensystem damit wesentlich gestützt ist. Kürzlich haben Bufano und Masini (1928) mitgeteilt, dass sie an drei Diabetikern bei Ergotaminzufuhr eine Erhöhung der Toleranz gegen Kohlenhydrate nachweisen konnten, wodurch die Autoren zur Meinung geführt wurden, dass das Mittel für Diabetesbehandlung anwendbar sei. Pollak (1927) hat auch am Kaninchen gefunden, dass Ergotaminbehandlung die nach peroraler Zuckerzufuhr gewonnene Blutzuckerkurve deutlich abflacht.

Was endlich die Wirkung des Ergotamins auf den nüchternen Blutzuckerwert betrifft, sind die Angaben der Autoren nicht übereinstimmend. Lesser und Zipf (1923) fanden am Kaninchen nach Ergotamininjektion eine leichte Blutzuckersenkung, aber beim menschlichen Diabetiker nur in einem Fall eine solche Wirkung, während sie in anderen Fällen vermisst wurde. Hetényi und Pogany (1926) wie Silberstein und Kessler (1927) gaben an, dass sie am Kaninchen den Befund der oben genannten Autoren bestätigen konnten. Seidel (1927) konnte auch in sämtlichen Versuchsgruppen am Menschen wie am Kaninchen eine hypoglykämisierende Wirkung des Ergotamins nachweisen. Dagegen wollen eine Reihe Autoren eine solche Wirkung auf Nüchternwert ablehnen. Am normalen Kaninchen konnten Miculicich (1912), Rothlin (1925), Pollak (1927), Sakurai (1926) und Masamune (1926) keine Hypoglykämie nach Ergotamin- oder Ergotoxininjektion nachweisen. Bei Untersuchungen von Grunke (1926) an zwei Zuckerkranken und an sechs Nichtdiabetikern blieb der Nüchterwert durch Ergotaminzufuhr unbeeinflusst. Moretti (1928) vermisst auch beim Gesunden eine hypoglykämisierende Wirkung des Alkaloides im nüchternen Zustande. Aber er fand am menschlichen Diabetiker und am Pankreashunde eine solche Erscheinung.

Wie oben auseinander gesetzt, sind die Untersuchungen am Menschen noch relativ gering und gehen sogar die Ansichten der Autoren über die Wirkung des Ergotamins auf Nüchternwert ganz auseinander. Bei solcher Sachlage habe ich auf Veranlassung und

unter Leitung von Prof. R. Inada und K. Sakaguchi mich mit dieser Frage beschäftigt.

Bei meinen Untersuchungen habe ich als Ergotaminpräparat "Gynergen" (Ergotaminum tartaricum) zum Gebrauch genommen und dessen Einfluss auf den Blutzuckergehalt am Nichtdiabetiker und am Zuckerkranken, wie am normalen und pankreatomierten Hunde untersucht. Blutzuckergehalt habe ich dabei nach Bangscher Mikromethode bestimmt.

A. EINFLUSS DES ERGOTAMINS AUF DEN NÜCHTERNEN BLUTZUCKERWERT.

1. Versuche am kohlenhydratstoffwechselgesunden Menschen und am normalen Hunde.

Weil der Blutzuckergehalt auch beim Gesunden selbst morgens in nüchternem Zustande nicht ganz unbeweglich bleibt, so habe

TABELLE I.

Fall	Datum	Ergota- min mg	Blutzuckergehalt mg %					
	1928		vor	$\frac{1}{2}$ Std.	1	1 $\frac{1}{2}$	2	
I. H.K. 35 j. Asthma bronchiale	13.II	0,25	72	71	83	72	80	62
	16.II	0	74	85	74	88	69	67
	17.II	0,25	78	85	74	73	67	65
	20.II	0	88	83	82	80	76	76
II. M.S. 50 j. Gastroptose	13.II	0,25	88	97	103	102	94	91
	16.II	0	91	94	74	75	72	76
	17.II	0,25	73	70	71	67	71	110
	19.II	0	70	70	81	71	60	58
III. H.S. 16 j. Verdacht auf Rückenmarks- tumor	22.II	0	80	76	76	79	82	71
	23.II	0	74	73	71	70	68	65
	24.II	0,25	71	72	80	81	66	66
	25.II	„	74	79	61	83	66	68
IV. S.M. 38 j. Hirntumor	24.II	0	81	77	76	72	73	72
	15.II	0	79	79	70	70	66	71
	17.II	0,25	75	75	79	68	69	68
	29.II	„	84	74	73	73	73	72

ich in allen Fällen ausser eigentlichen Untersuchungen auch Kontrollversuche angestellt. Beim letzteren wurde 0.25 mg Ergotamin subkutan injiziert und danach drei Stunden lang der Blutzucker halbstündlich untersucht. Beim ersteren wurde genau dieselbe Untersuchung ohne Ergotamininjektion ausgeführt.

Wie die Tabelle zeigt, trifft man gewöhnlich den niedrigsten Wert in der dritten Versuchsstunde an. Weil diese Senkung des Blutzuckergehaltes nicht nur nach Ergotamininjektion, sondern auch bei Kontrollversuchen beobachtet wird, so besteht kein Zweifel, dass diese Erscheinung mit der Ergotaminzufuhr nichts zu tun hat. Ebensowenig ist ein leichter Blutzuckeranstieg, welcher oft während der Versuchszeit zustande kam, mit der Injektion in Zusammenhang zu bringen. Kurz, ich habe in vorliegenden Versuchen am Menschen niemals einen deutlichen Einfluss von 0.25 mg Ergotamin auf den nüchternen Blutzuckerwert beobachtet.

Weil beim Menschen grössere Ergotaminzufuhr gewöhnlich unangenehme Nebenerscheinungen verursacht, so habe ich bei meinen Versuchen von dem Gebrauch einer grösseren Dose abgesehen. Die Versuche mit einer grösseren Dosis sind am Hunde angestellt worden. Dazu wurden Hunde von ca. 10 kg. Körpergewicht mit 1 mg Ergotamin subkutan oder intravenös injiziert und dessen Einfluss auf Nüchternblutzuckerwert untersucht.

Aus der Tabelle ersieht man, dass die Blutzuckerkurve bei subkutaner und intravenöser Ergotamininjektion kaum voneinander nachweisbaren Unterschied zeigt. Aber man darf wohl hier nicht verkennen, dass der Blutzuckerwert bei Kontrollversuchen stets über 76 mg betrug, während er zwei oder drei Stunden nach der Injektion häufig einen niedrigeren Wert zeigte und sogar oft unter 60 mg gefunden wurde.

Bei diesen Befunden könnte man wohl behaupten, dass das Alkaloid in gewissem Masse auf den Nüchternwert hypoglykämierend einwirkt. Aber ich möchte mit diesem Schluss etwas zurückhaltend sein, weil die Blutzuckersenkung kaum auffallend und nicht eindeutig ist.

TABELLE II.

Hunde.	Datum	Ergotamin	Blutzuckergehalt mg %					
Nr.	1927-8	mg	vor	$\frac{1}{2}$ Std.	1	$1\frac{1}{2}$	2	3
I 12 kg	25.XI	1.0 (subkutan)	84	98	91	76	76	70
	26.XI	„	89	99	81	83	79	65
	29.XI	0	100	92	90	96	87	80
	30.XI	0	101	94	92	92	90	84
	2.XII	1.0 (intravenös)	91	88	85	90	92	95
	6.XII	„	70	85	88	80	71	67
II 10 kg	17.I	0.5 (subkutan)	95	92	86	75	72	66
	18.I	„	99	96	81	93	85	59
	20.I	0.5 (intravenös)	73	82	85	78	79	66
	22.I	„	74	82	72	65	63	60
	23.I	0	85	87	92	81	86	78
	24.I	0	79	86	92	93	92	93
III 11 kg	21.I	0.5 (subkutan)	80	103	80	84	82	56
	23.I	„	78	104	88	84	63	59
	24.I	0.5 (intravenös)	72	90	76	70	69	78
	25.I	„	74	90	88	92	71	60
	8.II	0	75	88	86	85	81	76
	9.II	0	97	83	90	83	73	86
IV 10.5 kg	8.II	0.5 (subkutan)	76	76	85	75	66	72
	9.II	„	81	90	78	68	70	66
	11.II	0	84	81	90	88	83	80
	12.II	0	85	92	103	90	93	87
	27.II	0.5 (intravenös)	71	80	67	70	66	60
	29.II	„	91	90	94	73	77	72
V 11 kg	9.II	0.5 (subkutan)	85	86	84	76	65	66
	11.II	0	86	93	83	71	73	83
	12.II	0	101	86	84	82	78	84
	26.II	0.5 (subkutan)	78	74	73	72	76	76
	28.II	0.5 (intravenös)	78	78	81	91	78	77
	29.II	„	88	80	86	77	79	77

2. *Versuche am Zuckerkranken und am Pankreashunde.*

Wie schon erwähnt, hat Moretti (1928) nur am Diabetiker gefunden, dass der Nüchterwert nach Ergotamininjektion herabsinkt, während eine solche Erscheinung beim Gesunden vermisst wird. Auch Seidel (1927) gibt an, dass Senkung des Nüchterwertes nach der Injektion beim Zuckerkranken ausgeprägter ausfällt, als beim Nichtdiabetiker. Hier fehlt leider die Angabe über das Verhalten des Blutzuckers ohne Ergotaminzufuhr. Bekanntlich zeigt der nüchterne Blutzuckerwert im normalen Zustande nur eine undeutliche Schwankung. Aber beim Diabetiker mit einer starken Hyperglykämie, besonders wenn er am vorangehenden Tage kohlenhydratreich ernährt ist, zeigt der Blutzucker eine deutliche Herabsetzung, wenn der Kranke eine lange Zeit nüchtern gehalten wird. Auf diese Erscheinung sollte eigentlich stets Rücksicht genommen werden, wenn man Ergotaminwirkung auf Nüchterwert des Diabetikers untersuchen will. Unter den früheren Autoren scheint meines Wissens nach nur Grunke diesen Umstand berücksichtigt zu haben. Beim Diabetiker beobachtete er eine Blutzuckersenkung nach einer Ergotamininjektion. Weil dieser Abstieg aber nicht grösser war, als unter dem Einflusse des Hungers beobachtet, so schliesst der Autor, dass Ergotamin auch beim Diabetiker den nüchternen Blutzuckerwert nicht beeinflusst.

Bei meinen Untersuchungen, wo Ergotaminwirkung auf den Nüchterwert am Diabetiker und am Pankreashunde beobachtet wurde, habe ich immer auf diese Hungerwirkung achtgegeben.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, zeigte der Blutzuckergehalt nach der Injektion von 0.25–0.5 mg Ergotamin bei hyperglykämischen Zuckerkranken eine deutliche Herabsetzung. Weil aber eine solche Blutzuckerabnahme auch bei Kontrollversuchen in demselben Grade zum Vorschein kam, so liegt der Gedanke nahe, dass diese Erscheinung wesentlich auf einer Hungerwirkung und nicht auf einer Ergotaminzufuhr beruht. Ebenso wenig wurde auch bei normoglykämischen Kranken eine sicher nachweisbare hypogly-

TABELLE III.

Fall	Datum	Ergota- min	Blutzuckergehalt mg %						Maximale prozen- tuale Herab- setzung
	1927-8	mg	vor	$\frac{1}{2}$ Std.	1	$1\frac{1}{2}$	2	3	
I T.M. 38 j.	18.X	0	72	71	76	73	71	77	1
	21.X	0	75	81	70	75	75	69	7
	19.X	0.5	95	90	86	83	98	77	13
	22.X	„	76	77	72	83	79	78	5
II G.S. 32 j.	21.X	0	273	252	251	244	244	254	11
	21.XI	0	390	363	373	350	356	331	15
	22.X	0.5	295	280	283	283	280	294	5
	22.XI	0.3	295	314	295	275	265	278	10
III Y.I. 40 j.	16.XI	0	157	157	150	147	146	142	10
	19.XI	0	185	185	184	170	166	160	14
	17.XI	0.3	136	135	138	134	123	130	10
	21.XI	0.5	164	158	159	159	155	162	5
IV Y.K. 39 j.	23.IV	0	247	244	231	229	226	225	9
	24.IV	0.25	260	275	268	250	255	246	5
V T.L. 62 j.	23.IV	0	104	88	98	84	83	80	23
	24.IV	0.25	110	84	84	91	75	76	31
	26.IV	0	96	93	84	85	74	75	21
	27.IV	0.25	94	93	89	87	81	75	20
VI Y.K. 21 j.	23.IV	0	183	170	163	137	132	126	31
	25.IV	0.25	154	146	129	126	115	113	27

kämisierende Wirkung des Alkaloides beobachtet.

Zunächst habe ich Pankreashunden von ca. 10 kg Körpergewicht 0.5–1 mg Ergotamin subkutan injiziert und dessen Einfluss auf den Blutzuckergehalt bei leerem Magen untersucht.

TABELLE IV.

Hund.	Datum	Ergota- min	Blutzuckergehalt mg %						Maximale prozen- tuale Herab- setzung
Nr.	1927	mg	vor	$\frac{1}{2}$ Std.	1	1 $\frac{1}{2}$	2	3	
I 12 kg	11.XII	0	197	190	188	170	159	151	23
	12.XII	1	325	313	324	309	274	275	16
	13.XII	0	285	280	273	260	255	250	12
	14.XII	1	298	283	290	275	260	253	15
II 11 kg	12.XII	0	204	203	195	189	173	165	14
	13.XII	1	256	265	250	241	231	225	12
	14.XII	0	276	260	269	253	251	248	10
	15.XII	1	290	286	280	273	257	260	11
III 12.5 kg	12.XII	0	178	179	170	165	160	156	12
	13.XII	0.5	257	263	251	243	240	230	11
IV 11.5 kg	14.XII	0	178	180	175	160	165	162	15
	15.XII	0.5	167	170	165	153	156	145	13
	16.XII	0	163	168	163	157	150	146	10
	17.XII	0.5	181	186	170	173	168	170	6

Hier war das Untersuchungsergebnis genau dasselbe wie bei hyperglykämischen Zuckerkranken. Obwohl der Blutzuckergehalt nach der Injektion mit der Zeit sank, ist zu beachten, dass eine Herabsetzung auch bei Kontrollversuchen stattfand.

Aus diesen Untersuchungsergebnissen muss ich also schliessen, dass Ergotamin bei Zuckerkranken und bei Pankreashunden den nüchternen Blutzuckerwert nicht nachweisbar herabsetzt.

TABELLE V.

Fall	Datum	Ergota- min $\frac{1}{4}$ Stunde vor dem Essen. mg	Blutzucker nach Probekost. (270 g gekochter Reis + 2 Hühnereier)						Prozen- tualer Anstieg
	1928		vor	$\frac{1}{2}$ Std.	1	1 $\frac{1}{2}$	2	3	
I H.K. 35 j. Asthma bronchiale.	2.II	0	60	133	105	95	93	84	122
	3.II	0	58	102	83	84	71	66	76
	14.II	0.25	70	117	83	100	85	84	67
	15.II	„	74	112	110	106	103	89	51
II M.Y. 50 j. Gastroptose	9.II	0	85	120	131	112	123	113	54
	10.II	0	76	157	124	102	102	101	106
	14.II	0.25	101	126	125	105	87	137	36
	15.II	„	82	118	121	101	77	146	78
III S.K. 26 j. Ankylostomiasis.	15.II	0	81	122	137	123	125	109	69
	16.II	0	105	137	124	120	121	107	30
	18.II	0.25	68	117	96	98	70	72	72
	20.II	„	81	128	99	86	105	97	58
IV S.T. 18 j. Rückenmark tumor?	15.II	0	78	140	112	110	109	90	79
	16.II	0	80	147	146	125	123	116	84
	17.II	0.25	76	91	101	115	97	93	51
	18.II	„	98	85	95	114	103	112	16
V H.S. 16 j. Verdacht auf Rückenmark tumor.	15.II	0	97	99	93	92	85	79	2
	16.II	0	85	115	105	108	104	79	35
	17.II	0.25	70	72	68	61	66	94	34
	18.II	„	60	66	74	77	92	92	53

B. EINFLUSS DES ERGOTAMINS AUF DIE ALIMENTÄRE HYPERGLYKÄMIE.

Wie erwähnt, stimmen die Angaben einiger Autoren darin überein, dass das Ergotamin deutlich depressorisch auf die alimentäre Hyperglykämie wirkt. Aber die Zahl der Untersuchungen am Menschen scheint mir noch nicht ausreichend zu sein, als dass die Frage schon für ganz abgeschlossen gehalten werden könnte. Aus diesem Grunde habe ich auch an mehreren Nicht-diabetikern und Zuckerkranken Untersuchungen angestellt.

1. Untersuchung am Nichtdiabetiker.

Hier ging ich so vor, dass ich den Versuchspersonen zuerst als Kontrolle die bei uns gebräuchliche Sakaguchische Probekost, welche aus 270 g gekochten Reis (=100 g lufttrockenem Reis) und zwei Hühnereiern besteht, verabreichte und in den eigentlichen Versuchen 0.25 mg Ergotamin $\frac{1}{4}$ Stunde vor dieser Nahrungszufuhr subkutan injizierte. Bei allen Versuchen wurde der Blutzucker halbstündlich zwei Stunden lang, dann stündlich bis auf drei Stunden untersucht. Das Resultat ist in Tabelle V angegeben.

Aus diesem Resultate habe ich die folgende Übersichtstabelle zusammengestellt.

TABELLE VI.

Fall	Maximale alimentäre Blutzuckersteigerung			
	Kontrollversuch		Ergotaminversuch	
	Höchster	Blutzuckerwert mg% (relative Zunahme)	Höchster	Blutzuckerwert mg% (relative Zunahme)
I	133 u. 102	(121 u. 76%)	117 u. 112	(67 u. 51%)
II	131 u. 157	(54 u. 106%)	137 u. 146	(35 u. 78%)
III	137 u. 137	(69 u. 30%)	117 u. 128	(72 u. 58%)
IV	140 u. 147	(79 u. 84%)	115 u. 114	(51 u. 16%)
V	99 u. 115	(2 u. 35%)	94 u. 92	(34 u. 33%)

Aus den Tabellen kann man ersehen, dass Ergotamin (0.25 mg) auf die alimentäre Hyperglykämie oft, aber nicht immer deutlich hemmend einwirkt. Es fehlt auch nicht an Fällen, wo eine solche Wirkung ganz vermisst wird. Weil bekanntlich die Empfindlichkeit gegen Ergotamin individuell sehr verschieden ist und von vielen Seiten darüber mitgeteilt wird, dass das Alkaloid in kleiner Dose oft gar nicht und erst in einer grösseren eine deutliche depressorische Wirkung hervorruft, so will ich auch bei meinen Fällen die Möglichkeit nicht absolut zurückweisen, dass eine Hemmung der alimentären Blutzuckersteigerung bei grösserer Ergotaminzufuhr noch deutlicher in Erscheinung treten würde. Weil ich aber bei den von mir angewendeten Dosen schon häufig unangenehme Nebenerscheinungen wie Schwindel, Nausea, Oppressionsgefühl der Brust und anderes beobachtete, so habe ich den Versuch mit einer vergrösserten Dosis nicht ausgeführt.

2. *Untersuchung am Diabetiker.*

Bei Versuchen am Diabetiker wählte ich ein solches Stadium, wo die Toleranz der Zuckerkranken annähernd konstant blieb, und verabreichte den Kranken nur eine solche Kohlenhydratmenge, dass alimentäre Hyperglykämie nicht zu stark auftrat. Unter diesen Zuständen wurde der Versuch mit oder ohne Ergotamin wiederholt, indem bei Ergotaminversuchen Kohlenhydrat in derselben Menge wie bei den Kontrollversuchen oder etwas vermehrt verabreicht wurde. Gewöhnlich injizierte ich subkutan 0.25 bis 0.5 mg Ergotamin $\frac{1}{4}$ Stunde vor der Nahrungszufuhr. Nur in einigen Fällen wurde 0.5 mg Ergotamin geteilt verordnet, nämlich $\frac{1}{4}$ Stunde vor der Kohlenhydrataufnahme und $1\frac{1}{2}$ Stunden nach dem Essen je 0.25 mg. Die einzelnen Daten sind in Tabelle VII wiedergegeben.

Obwohl die hemmende Wirkung des Ergotamins auf die alimentäre Hyperglykämie bei den Fällen II und IV nicht deutlich war, so kann man doch bei allen übrigen Fällen eine mehr oder minder ausgeprägte Hemmung aus der Tabelle ersehen. Diese Wirkung geht aber nicht immer mit der Ergotaminmenge parallel

TABELLE VII.

Fall	Datum	gekochter Reis.	Ergotamin	Blutzuckeraustieg mg %						prozentualer Anstieg
	1927	g.	mg	vor	$\frac{1}{2}$ Std	1	$1\frac{1}{2}$	2	3	
I S.M. 52 j.	28.VII	180	0	104	125	126	119	108	109	13
	30.VII	„	0.5	115	116	108	113	105	106	1
	5.VIII	180	0	105	132	127	115	103	105	26
	6.VIII	200	0.5	99	118	122	120	101	107	23
II T.T. 28 j.	2.VIII	80	0	132	131	155	154	165	160	25
	6.VIII	„	0.5	125	116	120	115	107	151	21
	8.VIII	100	„	116	126	119	114	121	162	40
	9.VIII	„	0	137	143	161	165	166	177	29
III Y.S. 62 j.	21.IX	145	0	95	148	171	161	161	97	80
	22.IX	„	0.3	90	130	142	115	116	129	58
	26.IX	165	0.5	97	116	121	104	112	157	62
	27.IX	„	0	93	170	194	169	167	95	109
	29.IX	„	0.5 zweimal geteilt	96	120	125	120	115	129	30
IV Y.N. 46 j	29.IX	350	0	113	167	187	186	161	155	66
	1.X	„	0.5	89	92	116	128	134	153	72
	3.X	„	0.3	92	98	120	126	119	128	38
	4.X	„	0	97	109	144	170	162	158	75
V T.M. 38 j	3.X	70	0	95	107	124	105	98	91	31
	4.X	„	0.5 zweimal geteilt	87	80	108	106	107	85	24
	8.X	100	0.5	90	89	78	98	118	89	31
	10.X	70	0	87	95	123	132	118	105	51
VI G.N. 28 j.	8.XII	70	0	103	121	141	147	140	111	43
	9.XII	80	0.5	109	118	123	154	105	103	41
	12.XII	„	„	110	108	119	128	149	141	35
	13.XII	„	0	103	131	131	169	173	147	68
VII M.N. 47 j	8.XII	180	0	98	131	146	169	143	119	72
	9.XII	„	0.4	93	105	116	118	143	128	54
	12.XII	250	„	98	163	150	138	128	136	66
	13.XII	„	0	102	151	185	235	201	176	130
VIII S.T. 52 j	11.XII	250	0	108	145	170	158	141	103	57
	12.XII	300	0.4	95	111	92	95	135	156	64
	13.XII	„	„	100	100	106	138	154	137	54
	14.XII	250	0	103	155	176	150	151	90	71
IX Y.A. 35 j.	11.XII	170	0	104	152	163	166	150	146	60
	12.XII	200	0.5	121	106	109	119	145	105	20
	15.XII	240	„	103	105	126	156	167	154	62
	17.XII	180	0	113	135	143	160	158	121	42

und wie es von vornherein zu erwarten ist, kann man die alimentäre Hyperglykämie durch Ergotamin nicht vollständig unterdrücken. Dass im Fall 1 am 30. Juni nach Ergotamin der Blutzuckeranstieg ganz ausblieb, stellt eine Ausnahme dar. Weil die Herabdrückung der Hyperglykämie durch Ergotamin also nur beschränkt ist und ausserdem danach noch häufig unangenehme Nebenerscheinungen zum Vorschein kommen, so kann ich mich nicht der Ansicht einiger Autoren ohne weiteres anschliessen, welche dem Ergotamin einen besonderen Wert für die Behandlung der Zuckerkrankheit zuschreiben.

SCHLUSS.

1. Bei meinen Untersuchungen am kohlenhydratstoffwechselgesunden Menschen konnte ich nach der Injektion von 0.25 mg Ergotamin niemals eine sicher nachweisbare Senkung des nüchternen Blutzuckerwertes beobachten. Bei Versuchen am Hunde mit einer grösseren Alkaloidmenge wurde der Blutzuckerwert zwei oder drei Stunden nach der Injektion häufig niedriger gefunden als bei Kontrollversuchen. Aber der Unterschied war so unbedeutend, dass man daraus nicht sicher auf die hypoglykämisierende Wirkung des Alkaloides schliessen konnte.

2. Bei hyperglykämischen Zuckerkranken wie bei Pankreas-hunden wurde eine deutliche Senkung des Blutzuckerwertes nach der Ergotamininjektion beobachtet. Weil eine solche Blutzuckerabnahme auch bei Kontrollversuchen fast in gleichem Grade zustande kam, so muss man diese Erscheinung nicht auf Ergotaminzufuhr sondern auf die Hungerwirkung zurückführen.

3. Beim Nichtdiabetiker wirkt 0.25 mg Ergotamin auf die alimentäre Hyperglykämie nicht immer, aber oft deutlich hemmend.

4. Beim Diabetiker wirkt 0.3–0.5 mg Ergotamin in der Regel mehr oder minder deutlich unterdrückend auf die alimentäre Hyperglykämie. Weil diese depressorische Wirkung aber beschränkt ist und dabei häufig unangenehme Nebenerscheinungen zustande

kommen, so scheint es mir fraglich, ob das Alkaloid als antidiabetisches Mittel irgend eine wichtige Rolle spielen kann, wie einige Autoren behaupten.

LITERATUR.

- Bufano, M. u. Masini, A., (1928): citiert nach Münch. med. Wochens., **8**, 372, 1928.
- Eda, G., (1928): Journ. of Biochem., **9**, 1, 285.
- Grunke, W., (1926): Zeits. f. d. ges. exp. Med., **52**, 488.
- Hetényi, S. u. Pogany, J., (1926): Verhandl. d. Kong. f. inn. Med., **38**, 306.
- Lesser, E. J. u. Zipf, K., (1923): Biochem. Zeits., **140**, 612.
- Masamune, H., (1926): Fukuoka Ikwadaigaku Zashi, **19**, 254.
- Miculicich, M., (1912): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **69**, 133.
- Moretti, E., (1928): Kl. Wochens., **9**, 407.
- Pollak, L., (1927): Kl. Kochens., **41**, 1942.
- Rothlin, E., (1925): Kl. Wochens., **30**, 1437.
- Sakurai, T., (1926): Journ. of Biochem., **6**, 487.
- Seidel, W., (1927): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **125**, 269.
- Silberstein, F. u. Kessler, S., (1927): Biochem. Zeits., **181**, 333.

ON THE INFLUENCE OF THE AMMONIUM ION ON THE QUINHYDRONE ELECTRODE POTENTIAL.

By

MASUZO SHIKATA AND ISAMU TACHI.

*(From the Chemical Institute, Department of Agriculture,
Kyoto Imperial University).*

(Received for publication, August 20, 1928).

Since Biilmann (1921) proposed the applicability of the quinhydrone electrode to the measurement of hydrogen ion concentration (1921), this electrode has been used for pH measurement in technical as well as in biological problems.

The range of its applicability was also investigated by the same author and others (1927) and it was proved that it could be depended on to measure accurately even as small amount as 0.0005 volts in an acidic as well as in a slightly alkaline solution (under pH 8.5).

Sörensen (1921) and Lindström-Lang (1925) studied the influence of cations (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+) and anions (Cl^- , Br^- , I^-) on the quinhydrone electrode potential. The effect seems to be the salting out action of those ions.

O'Sullivan (1925) showed that the quinhydrone electrode could be employed in measuring the pH of solutions containing metallic ions such as copper, tin, lead and nickel. Biilmann (1921, 1927) too, proved that it could be applied also in the presence of nitrate and hypochlorite ions. Those phenomena are ascribed to the reducing action of the quinhydrone electrode being weaker than the platinum-hydrogen electrode.

However, the present authors, in working with the quinhydrone electrode, found that the quinhydrone electrode did not give any stable potential in an ammonium salt solution, such as NH_4Cl . After 24 hours it even became more positive.

Moreover, it was observed that when quinhydrone was kept in an ammonium chloride solution, its colour changed to reddish brown, red and at last reddish violet and after a few day, a flocky brownish yellow substance was seen on the surface of the solution and this changed to a black precipitate.

The present authors undertook the following experiments in order to find the reason for this anomaly.

1. EXPERIMENTAL PART.

The potential differences of the following cell were measured with various ammonium salts at 25°C.

Pt.	0.15 g. quinhydrone in 15 cc. of 0.1 n NH_4Cl	saturated KCl solution	0.1 n KCl Hg_2Cl_2 solid	Hg.
-----	--	---------------------------	---	-----

The results of these measurements in Table I, II and III are shown in Fig. 1.

The most marked feature in those results is that the electrode potentials in inorganic ammonium salt solutions (Cl' and SO_4'') changed conspicuously, as if the hydrogen ion concentration in-

TABLE I.

T (minute)	0.1 n $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		0.1 n NH_4Cl		0.1 n NH_4Cl (brown coloured vessel)	
	E. M. F. (volt)	pH	E. M. F. (volt)	pH	E. M. F. (volt)	pH
15	+0.0257	5.68	+0.0612	5.08	+0.0595	5.11
30	+0.0325	5.56	+0.0735	4.87	+0.0722	4.89
45	—	—	+0.0850	4.68	—	—
60	+0.0498	5.27	+0.0894	4.60	+0.0928	4.54
90	+0.0647	5.02	+0.1004	4.42	—	—
120	+0.0750	4.85	+0.1088	4.27	+0.1110	4.24
150	—	—	+0.1130	4.22	+0.1178	4.12

Remarks: pH with hydrogen electrode for 0.1 n NH_4Cl = 5.54

“ “ “ “ “ 0.1 n $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ = 6.46

“ by the calculation from dissociation const. 0.1 n NH_4Cl = 5.26

(Denham)

TABLE II.

T (minute)	0.1 n NH ₄ -acetate		10 cc. 0.1 n NH ₄ -acetate + 5 cc. 0.1 n (NH ₄) ₂ SO ₄		10 cc. 0.1 n NH ₄ -acetate + 5 cc. 0.1 n NH ₄ Cl		5 cc. 0.1 n NH ₄ -acetate + 10 cc. 0.1 n NH ₄ Cl	
	E. M. F. (volt)	pH	E. M. F. (volt)	pH	E. M. F. (volt)	pH	E. M. F. (volt)	pH
15	+0.0430	5.39	+0.0441	5.37	+0.0430	5.39	+0.0436	5.38
30	+0.0432	5.38	+0.0435	5.38	+0.0436	5.38	+0.0432	5.38
45	+0.0432	5.38	+0.0435	5.38	+0.0430	5.39	+0.0438	5.37
60	—	—	+0.0432	5.38	+0.0434	5.38	+0.0433	5.38
90	—	—	—	—	+0.0427	5.39	+0.0433	5.38
120	+0.0432	5.38	+0.0428	5.39	+0.0426	5.39	+0.0434	5.38
150	+0.0432	5.38	+0.0428	5.39	—	—	—	—

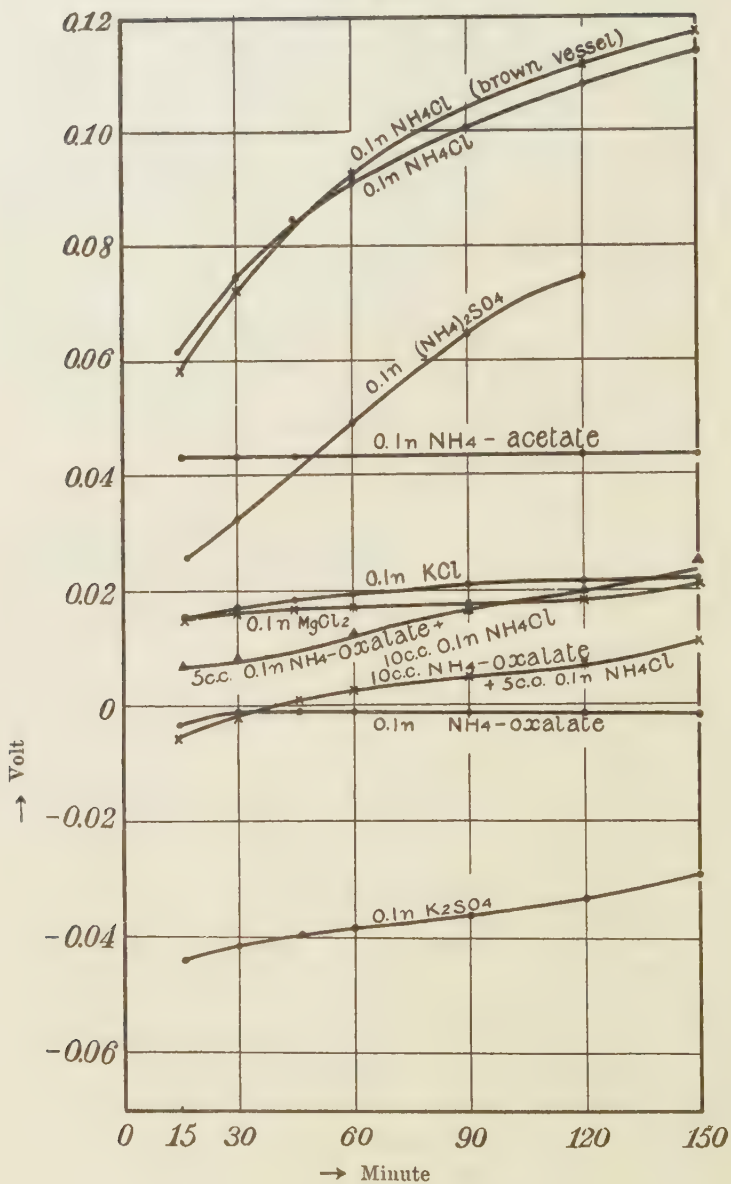
TABLE III.

T (minute)	0.1 n NH ₄ oxalate		5 cc. 0.1 n NH ₄ -oxalate + 10 cc. 0.1 n NH ₄ Cl		10 cc. 0.1 n NH ₄ -oxalate + 5 cc. 0.1 n NH ₄ Cl	
	E. M. F. (volt)	pH	E. M. F. (volt)	pH	E. M. F. (volt)	pH
15	-0.0032	6.18	+0.0076	5.99	-0.0048	6.20
30	-0.0009	6.13	+0.0082	5.98	-0.0012	6.13
45	-0.0009	6.13	—	—	+0.0011	6.10
60	-0.0009	6.13	+0.0123	5.91	+0.0027	6.07
90	-0.0011	6.13	+0.0176	5.82	+0.0048	6.03
120	-0.0011	6.13	+0.0208	5.76	+0.0080	5.99
150	-0.0011	6.13	+0.0245	5.70	+0.0107	5.93

creased nearly ten times in two and half hours, while in ammonium salts of organic acid solutions (oxalate or acetate) the electrode potentials were nearly constant. Moreover, an addition of oxalate or acetate to NH₄Cl or (NH₄)₂SO₄ solutions stabilised its potential distinctly (see Table III).

Biilmann (1927) summarized the salt effect to the quin-

Fig. 1.



hydrone electrode, and explained after Lindström-Lang the effect of inorganic salts as the change of the hydrogen ion activity caused by their salting out effect.

But this deviation was not greater than 0.05 for pH in one normal salt solution, and for all practical purposes we need not take this effect into account in a not highly concentrated solution as 0.1 normal.

In order to ascertain this relation, we measured the electrode potential of the salt solution under the most unstable condition, that is, without any stabilising agent as is shown in Table IV.

TABLE IV.

T (minute)	0.1 n K_2SO_4		0.1 n KCl		0.1 n LiCl		0.1 n $MgCl_2$	
	E. M. F. (volt)	pH	E. M. F. (volt)	pH	E. M. F. (volt)	pH	E. M. F. (volt)	pH
15	-0.0434	6.85	+0.0162	5.84	+0.0156	5.85	+0.0158	5.85
30	-0.04'2	6.81	+0.0174	5.82	+0.0167	5.83	+0.0160	5.84
45	-0.0392	6.78	+0.0185	5.80	+0.0179	5.81	+0.0165	5.83
60	-0.0372	6.74	+0.0200	5.78	+0.0190	5.79	+0.0174	5.82
90	-0.0344	6.70	+0.0213	5.75	+0.0200	5.78	+0.0186	5.80
120	-0.0320	6.66	+0.0217	5.75	+0.0223	5.74	+0.0188	5.80
150	-0.0293	6.61	+0.0238	5.71	+0.0235	5.72	+0.0210	5.76

Here the hydroionogene group is hydroquinone itself, and still we see no marked change of pH, that is, smaller than 0.2 in most cases.

Thus it can be seen that the marked change of electrode potential, the acidifying inclination in unbuffered ammonium salt solutions could not be due to the salting out action and, further, that effect is incomparably greater than that of the salting out action under such conditions.

II. GENERAL CONSIDERATIONS.

Now we will consider the cause of this discrepancy.

In considering the quinhydrone electrode potential we have the Nernst formula.

$$\pi = -\frac{RT}{2F} \ln \frac{K [C_6H_4O_2H_2]}{[H']^2 [C_6H_4O_2]}$$

where $[C_6H_4O_2]$ is the concentration of benzoquinone

$[C_6H_4O_2H_2]$: the concentration of hydroquinone and

K : the characteristic constant for quinhydrone.

We will leave out the activity coefficients of the reacting substances, assuming it to be unity in the cases where the total concentration of the neutral salts are not over 1/10 normal.

Another factor of the potential to be taken into consideration is the adsorption of organic substances to the boundary layer of the platinum electrode.

One of the present authors (Shikata, 1925) in measuring the electrolytic reduction potential of nitrobenzene at the dropping mercury cathode, introduced the adsorption coefficients of organic substances in the Nernst formula.

Now following this idea, we may have for the quinhydrone electrode

$$\pi = -\frac{RT}{2F} \ln \frac{K [C_6H_4O_2H_2]^{\frac{1}{m'}}}{[H']^2 [C_6H_4O_2]^{\frac{1}{m}}} \dots\dots\dots (2)$$

where $\frac{1}{m}$ is the adsorption coefficient of quinone

$\frac{1}{m'}$ is the adsorption coefficient of hydroquinone.

It had been found that m in the case of nitrobenzene in the alkaline solution equals 2.2 and in acidic solution 1.26.

With regard to the quinhydrone electrode, if the neutral salts should selectively affect the adsorption of quinone or hydroquinone, its potential would also be influenced, because their adsorption coefficients would be changed.

This is quite plausible also in a small electrolyte concentration. But as will be seen in Table I and Table IV, the other

neutral salts, except ammonium salt, showed no marked discrepancy, and we could find no reason why ammonium salt alone is specific and is highly adsorptive to the platinum electrode.

Hence we might leave out the adsorption coefficient in formula(2) and consider formula(1). In this formula we have three factors $[H']$, $[C_6H_4O_2]$ and $[C_6H_4O_2H_2]$ responsible for the electrode potential a change of the potential to positive should be caused by an increase in $[H']$ and $[C_6H_4O_2]$, or a decrease in $[C_6H_4O_2H_2]$.

The change of colour of the electrode solution was suggestive of some photochemical action in the quinhydrone and the ammonium radical, so the measurements of the electrode potentials with an ordinary glass vessel and a brown coloured glass vessel were carried out (see Table I. last two columns and Fig. 1 the two upper curves).

It can be seen that no marked difference was observable between them and the photochemical influence was not conspicuous, if present at all.

The next possibility to be considered concerning the change of colour was the formation of a new compound from quinhydrone and the ammonium ion, and if this be true, the increase of the hydrogen ion concentration in the electrode solution is quite natural, and this reasoning is quite in accord with the inclination of electrode potential to become positive.

We tried to isolate this new substance.

We kept the saturated quinhydrone solution with an excess of ammonium chloride for three days and extracted with ether. We obtained a dark violet crystalline substance from the ether fraction, after evaporating a larger part of the ether and adding petrol ether. This crystalline substance with a metallic luster was quite similar in its appearance to quinhydrone, but had a higher solubility in water than the latter, and its aqueous solution was reddish violet.

After recrystallizing this crystalline substance (we will call

this "violet substance") its melting point was tested.

While quinhydrone, which was prepared with ferric ammonium sulphate after Biilmann (1923), sublimed partially at 150°C and melted at 172°C the violet substance partly sublimed at 145°C and melted at 164–165°C.

The melting point of the mixture of quinhydrone and the violet substance was 164–165°C.

This suggested some new compound contained in the violet substance other than quinhydrone. The aqueous solution of the violet substance, when treated with SnCl_2 and concentrated hydrochloric acid, discoloured and regained its colour when treated with FeCl_3 , neutralized with sodium acetate.

The nitrogen test with metallic sodium was positive and the nitrogen determination with Kjeldahl's methods showed the nitrogen contents to be 0.19%.

If one molecule of ammonium radical combined with one molecule of quinhydrone, the nitrogen content of the new compound should be 5.96%. We tried to isolate this new substance, but it was so similar in its properties with quinhydrone that we could not obtain a pure compound.

From the experiment described above, we were convinced that the acidifying effect of ammonium chloride was due to the combining of the ammonium radical with quinhydrone, resulting in the hydrolysis of NH_4Cl , and setting HCl free.

The change of the following cell potential followed which is given in Table V.

$$\text{Pt.} \left| \begin{array}{l} 0.1 \text{ n } \text{NH}_4\text{Cl } 15 \text{ c.c.} \\ 0.15 \text{ g. quinhydrone (solid)} \end{array} \right| 1 \text{ n } \text{KCl} \left| \begin{array}{l} \text{Hg}_2 \text{Cl}_2 \text{ (solid)} \\ 1 \text{ n } \text{KCl} \end{array} \right| \text{Hg.}$$

In order to obtain a clear view on the relation of the increase of the hydrogen ion concentration and the nitrogen content of the violet substance, the following measurements were undertaken.

3.2712 gm. of quinhydrone were dissolved in 3 litres of 0.1 n NH_4Cl solution (viz. 0.005 mol quinhydrone solution).

The pH value of this mixture was measured as usual with the

TABLE V.

Time		E. M. F. (volt)	pH
hr.	min.		
0.	30	+0.0947	5.42
1.	0	+0.1362	4.71
2.	0	+0.1560	4.39
6.	0	+0.1856	3.88
26.	0	+0.2153	3.37
50.	0	+0.2264	3.18
72.	0	+0.2366	3.01

addition of 0.15 gm. of quinhydrone for every measurement.

pH at the beginning of the experiment = 5.62 i.e.

$$[H'] = 2.2 \times 10^{-6}n$$

pH after 40 hours = 3.94 i.e. $[H'] = 1.2 \times 10^{-4}n$

If this increase in the hydrogen ion concentration was only due to the combination of the ammonium radical with quinhydrone, the nitrogen contents of quinhydrone after the experiment should be 0.15%.

This quinhydrone solution, which had been kept for 40 hours,

TABLE VI.

<i>1st experiment.</i>			
	Crystalline substance	N-content mg.	N-content of the fraction in %
1st fraction	0.3453	3.65	1.06
2nd „	0.3398	1.65	0.49
3rd „	0.2184	0.80	0.37
		Total N 6.10	
<i>2nd experiment.</i>			
1st fraction	0.3205	3.15	0.98
2nd „	0.3108	1.65	0.54
3rd „	0.2034	0.20	0.098
		Total N 5.00	

was extracted with ether three times, and each ether fraction was evaporated to obtain the violet substance. The nitrogen contents of the violet substance from each fraction were determined with Kjeldahl's method.

The results of the measurement are tabulated in Table VI 1st experiment. We found that the greater part of the nitrogen containing substance was extracted after three extractions. In other words, the violet substance is more easily extractable than quinhydrone itself.

By calculation, we found that the nitrogen content of the treated quinhydrone (total) was 0.183%.

The second experiment in Table VI was another experiment repeated in the same condition as the first one. Here we found the nitrogen content 0.15%.

Comparing the results with the calculated nitrogen content (i.e. 0.15%) from the potential deviation, we found a tolerably good agreement, although only an approximation.

From those results we may say that the increase of the hydrogen ion concentration was caused by the interaction of quinhydrone and the ammonium ion, splitting the acid radical free.

And this is in a good harmony with the fact that the ammonium salts of organic acids showed stable electrode potentials, thanks to their buffer action.

III. ELECTRODE POTENTIALS OF QUINHYDRONE, HYDROQUINHYDRONE, AND QUINO-QUINHYDRONE ELECTRODE IN THE PRESENCE OF AMMONIUM IONS.

It was thought to be desirable to determine which of the two components of quinhydrone, i.e. quinone or hydroquinone was responsible for the interaction.

Excess of quinone was added to the ammonium chloride solution for several days; the colour of the solution became purple, while with hydroquinone no conspicuous colour reaction was observed under the same condition.

This relation is observable with the electrode potential measurements as shown by Table VII and Table VIII and also in Fig. 2.

TABLE VII.

T (minute)	15 cc. 0.1 n NH_4Cl + 0.15 gm. quinhydrone + 1 gm. hydro- quinone		T (minute)	15 cc. 0.1 n NH_4Cl + 0.15 gm. quinhydrone + 2 gm. hydro- quinone	
	E. M. F. (volt)	pH		E. M. F. (volt)	pH
15	-0.0156	4.92	15	-0.0065	4.77
30	-0.0098	4.82	40	+0.0010	4.64
45	-0.0050	4.74	75	+0.0074	4.53
60	-0.0005	4.67	180	+0.0275	4.19
90	+0.0066	4.55			
120	+0.0120	4.46			
150	+0.0157	4.39			

TABLE VIII.

T (minute)	15 cc. 0.1 n NH_4Cl + 0.15 gm. quinhydrone + quinone (excess)	
	E. M. F. (volt)	pH
15	—	—
25	+0.1484	4.70
30	+0.1528	4.71
45	+0.1629	4.54
60	+0.1688	4.45
90	+0.1765	4.31
120	+0.1806	4.24
150	+0.1851	4.17

We found of the three electrodes, quinhydrone (Table I) hydroquinhydrone and quinoquinhydrone, the hydroquinone was relatively stable and the quinhydrone was most unstable.

We cannot conclude from these results only that quinhydrone reacts best to the ammonium ion, but it is quite probably so.

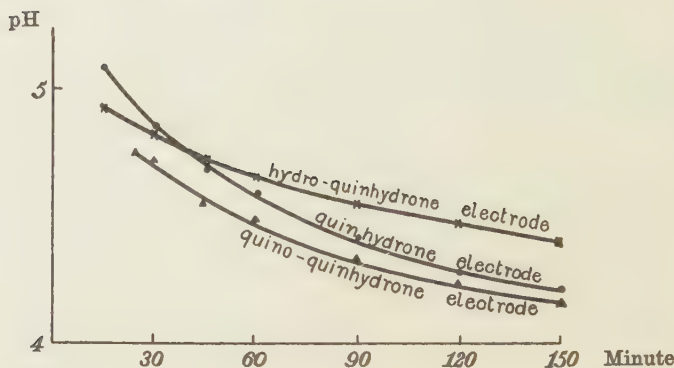


Fig. 2.

At least, we may say that if we want to avoid the effect of the ammonium ion as far as possible, hydro-quinhydrone is more suitable than the other.

IV. EXAMINATION ON THE REDUCTION POTENTIAL OF VIOLET SUBSTANCE.

Although we could not isolate a new compound from the violet substance, it was desirable to compare the reduction potentials of pure quinhydrone and the violet substance containing nitrogen.

The violet substance had been prepared in the same manner as described above and recrystallized with acetone.

The oxidation-reduction potential was measured in Mc Ilvaine's standard solution (pH=3.00) (0.2 M Na_2HPO_4 4.11 cc. + 0.1 M citric acid 15.89 cc.) as shown in Table IX.

As is seen in the table, the violet substance showed a slightly negative potential. In other words, it was as if the concentration of the quinhydrone component was smaller.

Still this small difference is quite incomparable with that of the potential deviation caused by the ammonium salts, and we are now quite certain, that the acidifying effect of the ammonium salt was really due to the liberation of the free acid.

TABLE IX.
McIlvaine's standard solution: pH=3.00

T (minute)	Quinhydrone electrode		Violet substance electrode	
	E. M. F. (volt)	pH	E. M. F. (volt)	pH
15	+0.1838	3.00	+0.1792	3.08
30	+0.1838	3.00	+0.1788	3.09
45	—	—	+0.1776	3.11
60	+0.1838	3.00	+0.1776	3.11
90	+0.1830	3.02	+0.1776	3.11
120	+0.1826	3.02	—	—
150	—	—	+0.1760	3.14

As has been described the violet substance contains about 0.19% of nitrogen. If we assume one molecule of quinhydrone combines with one ammonium radical, the combined quinhydrone is calculated to be about 6.0% of the total quinhydrone, so that the change of $[C_6H_4O_2]$ can not affect the electrode potential over a few millivolts.

It has been shown by the present authors (Shikata and Tachi, 1927; Shikata and Shoji, 1927) that a small quantity of a reducible substance can be detected by the dropping mercury cathode and the polarograph (Shikata and Tachi, 1927).

We have taken the polarogram of pure quinhydrone and the violet substance as is shown in Fig. 3 and Table XI.

This method, so far as quinhydrone is concerned, cannot be said to be suitable, because quinhydrone or quinone reacts with mercury and gives no stable potential.

The anode potential (anode correction π in Table X) was very changeable during the electrolysis, 20 to 60 millivolts becoming negative after the electrolysis.

Still if we avoid keeping the quinhydrone solution in contact

TABLE X.
Electrolytic reduction potentials.
(Polarographic method).

Quinhydrone		Violet substance									
Electrolytic solution: 218.10 ⁻⁵ g in 1 liter of 0.1 n K ₂ SO ₄											
Days after prepara- tion of solution	Anode correction π (volt)				Reduction potential (volt)	Height of saturation curve ($\times 10^{-4}$ A)	Anode correction π (volt)			Reduction potential (volt)	Height of saturation curve ($\times 10^{-4}$ A)
	Before elect- rolysis	After elect- rolysis	Shaken after elect- rolysis	Before elect- rolysis			After elect- rolysis	Shaken after elect- rolysis			
1		+0.007			$\begin{Bmatrix} -0.045 \\ -0.050 \end{Bmatrix}$	$\begin{Bmatrix} 2.2 \\ 2.0 \end{Bmatrix}$		+0.034		+0.034	2.2
1	+0.204	+0.182		+0.198	$\begin{Bmatrix} +0.053 \\ +0.035 \end{Bmatrix}$	$\begin{Bmatrix} 2.7 \\ 2.9 \end{Bmatrix}$	+0.198	+0.057(?)		$\begin{Bmatrix} -0.007 \\ 0.000 \end{Bmatrix}$	$\begin{Bmatrix} 2.7 \\ 2.5 \end{Bmatrix}$
2	+0.167	+0.137		+0.166	+0.025	4.7	+0.166	+0.142		+0.032	3.5
3	+0.162	+0.122		+0.162	$\begin{Bmatrix} +0.011 \\ +0.003 \end{Bmatrix}$	$\begin{Bmatrix} 5.3 \\ 6.2 \end{Bmatrix}$	+0.162	+0.117	+0.134	$\begin{Bmatrix} +0.025 \\ +0.014 \end{Bmatrix}$	$\begin{Bmatrix} 3.5 \\ 3.7 \end{Bmatrix}$
3	+0.185	+0.152	+0.150	+0.228	$\begin{Bmatrix} \text{I} \\ +0.120 \\ +0.117 \end{Bmatrix}$	$\begin{Bmatrix} \text{II} \\ 3.4 \\ 3.1 \end{Bmatrix}$	+0.228	+0.174	+0.209	$\begin{Bmatrix} \text{I} \\ +0.148 \\ +0.148 \end{Bmatrix}$	$\begin{Bmatrix} \text{II} \\ 8.4 \\ 8.2 \end{Bmatrix}$
4	+0.180	+0.167	+0.167	+0.145	$\begin{Bmatrix} +0.043 \\ +0.034 \end{Bmatrix}$	$\begin{Bmatrix} 3.8 \\ 3.5 \end{Bmatrix}$	+0.145	+0.118		$\begin{Bmatrix} +0.023 \\ +0.023 \end{Bmatrix}$	$\begin{Bmatrix} 2.7 \\ 2.9 \end{Bmatrix}$

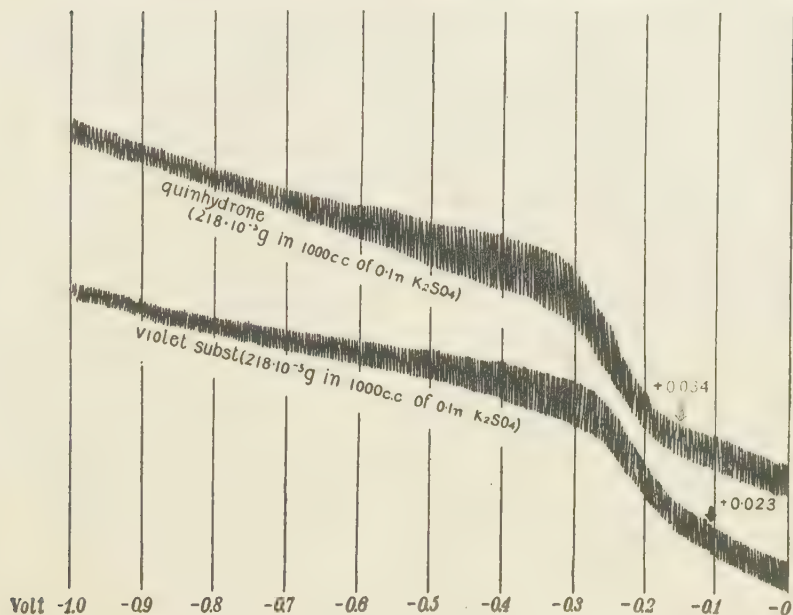


Fig. 3.

with mercury and pour it just before the electrolysis, the measurement is sufficient to give a general idea.

Now if the violet substance, or newly formed compound contained in that substance, should have quite a different reduction potential, some new wave other than that of the quinhydrone, should be found in the polarogram.

It can be seen in Fig. 3, that two compounds showed about the same type of the curves, same in the heights of the saturation curves, although the violet substance had a little more negative reduction potential than the pure quinhydrone. So we may say that the new compound has probably a similar reduction potential to that of quinhydrone.

V. CONCLUSION.

In conclusion, we may say that the acidifying effect of ammonium salts (sulphate and chloride) is ascribed to the inter-

action of quinhydrone with the ammonium radical, setting the acid free. The resulting product of the interaction was not isolated and it was impossible to determine whether it was a chemical compound or an adsorption compound.

The same reaction took place between quinhydrone and the ammonium salts of organic acids because the same change of colour as in the cases of sulphate and chloride was observed with those salts. However, in this case the change of potential was hardly recognizable owing to the buffer action of those salts.

In practice in the determination of pH with a quinhydrone electrode, the presence of the ammonium ion must be avoided as far as possible, and in an inevitable case the earlier reading after a definite time, say 15 or 30 minutes, must be taken because the reaction velocity is not so high, or it would be better to apply the hydro-quinhydrone electrode instead of quinhydrone.

VI. SUMMARY.

1. The influence of the ammonium ion on the quinhydrone electrode was found.

2. This acidifying influence proved to be the interaction of quinhydrone with the ammonium radical resulting in the liberation of free acids.

3. Although the new compound, which was formed of quinhydrone and the ammonium radical was not isolated, the evidence of the formation of such a compound was discussed from several standpoints.

4. A method to avoid the effect of ammonium ions was also proposed.

REFERENCES.

Biilmann, E. (1921). *Ann. chim.* (IX) **15**, 109-157.

Biilmann, E. (1923). *Trans. Faraday Soc.* **19**, 676.

Biilmann, E. (1927). *Bull. soc. chim.* **41-42**, 214.

Biilmann, E. and Jensen Langseth (1927). *Bull. soc. chim.* **41-42**, 151-191.

- Biilmann, E. and Lund (1921). *Ann. de chimie* (9) **16**. 321.
(Sur l'électrode à quinhydrone).
- Denham, H. G. (1908). *J. Chem. Soc.* **93**. 441.
- Linderstöm-Lang, K. (1925). On the salting-out effect. *Comptes rendus des trav. du Laboratoire de Carlsberg* **15**. No. 4.
- O'Sullivan (1925). *Trans. Faraday Soc.* **21**. 318.
- Rabinowitsh, A. J. and Kargin, V. A. (1927). *Z. Elek. Chem.* **33**. 11.
- Shikata, M. (1925). *Trans. Farady Soc.* **21**. 51.
- Shikata, M. (1927). *Memoirs College of Agr. Kyoto Imperial University* No. 4. 6.
- Shikata, M. and Shoji, K. (1927). *Memoirs. College of Agr. Kyoto Imperial University* **4**, 75.
- Shikata, M. and Tachi, I. (1927). *ibid.* **4**, 7-48.
J. Agr. Chem. Soc. Japan. **2** (1926) 610, **3** (1927) 746, **3** (1927) 1173, **4** (1928) 91.
- Sörensen, S. P. L., Sörensen, M. and Linderström-Lang, K. (1921). *Ann. de Chim.* (9) **16**. 283.

DIE pH-ABHÄNGIGKEIT DER GLYCEROPHOSPHATASE.

Von

KENTARO INOUE.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut zu Chiba.

Direktor: Prof. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 30. August 1928).

Die Angabe von Kobayashi über die Glycerophosphatase aus *Aspergillus oryzae* (1927) ist interessant, weil dieses Ferment in gereinigtem Zustande das Wirkungsoptimum in weit mehr saurer Reaktion als in noch nicht gereinigtem Zustande zeigt. Bei der Reinigung durch die Adsorptionsmethode wurde das Ferment von einer Substanz, der X-Substanz, befreit. Die Darstellungsmethode dieser Substanz wurde auch dabei mitgeteilt. Der Zusatz dieser Substanz brachte das pH-Optimum des gereinigten Ferments wieder zu der Acidität, in der das noch nicht gereinigte Ferment die maximale Wirkung ausübt. Ob diese bemerkenswerte Erscheinung im allgemeinen bei anderen Fermenten noch eine Analogie finden wird, bleibt noch dahingestellt, aber sie zeigt, dass die Angaben über die optimale Acidität der verschiedenen Fermente zum Teile noch verändert werden dürften.

Ich habe voriges Jahr über die Wirkung der Chemikalien auf die Glycerophosphatase berichtet. Die Untersuchungen wurden in weitem Umfange auf das gereinigte Ferment erstreckt und ergaben, dass einige Anionen in besonderer Art das Ferment beeinflussen können. Nähere Angaben werden bis zu der nächsten Mitteilung vorbehalten, hier seien nur die pH-Abhängigkeit der Glycerophosphatase mitgeteilt, da es mir bei der Reinigung des Ferments gelang, die vollständige Befreiung der X-Substanz zu verwirklichen und ich den Einfluss dieser Substanz auf die pH-Abhängigkeit der Glycerophosphatase geprüft habe.

Die unbehandelte Takaglycerophosphatase wirkt optimal bei pH 5.6, wie es wiederholt von uns bestätigt wurde. Ich konnte nun finden, dass die Reinigung durch die Kaolinadsorptionsmethode das Optimum zu pH 2.7–3.0 verschob. Nach der Angabe von Kobayashi war das Optimum nach der Reinigung durch Tonerdebehandlung in pH 3–4 und nach der Kaolinadsorption bald in pH 3.65, bald in pH 4.44 vorhanden. Er hat aber dabei angedeutet, dass das Ferment noch nicht genug von einem Paralytator, der X-Substanz, befreit war, und das pH-Optimum noch mehr nach der sauren Reaktion hin verschoben werden könne, wenn das Ferment weiter gereinigt würde. Dies wurde nun verwirklicht. Nach unserer jetzigen Erfahrung hängt die gute Abtrennung der X-Substanz bei der Kaolinadsorptionsmethode von der Beschaffenheit des Adsorbens ab. Das frisch gereinigte Kaolin ergab meistens ein schönes Resultat, aber als das Adsorbens lange der Laboratoriumluft ausgesetzt wurde, war die Reinigung unvollständig.

Die pH-Aktivitätskurve des gereinigten Ferments ist von eigentümlicher Natur. Sie erreicht ihren Gipfelpunkt bei pH 2.7–3.0. Der an der alkalischen Seite des Optimums liegende Schenkel zeigt einen typischen Verlauf, wie die Kurve des Kationdissoziations- oder Aniondissoziationsrestgrads. pK ist 4.8. Dieser Teil der pH-Aktivitätskurve ist spezifisch, wie es später beschrieben wird, und es wird angenommen, dass er mit der elektrochemischen Natur des betreffenden Ferments in innigem Zusammenhang steht. Der andere Teil der Kurve, der an der sauren Seite des Optimums liegt, neigt sich in einem ziemlich steilen Winkel gegen die Abszisse. Über diese Abweichung von der theoretischen Anforderung kann nichts Bestimmtes gesagt werden, aber die Inaktivierung des Ferments selbst durch die hohe Acidität mag daran teilgehabt haben. Jedenfalls lässt die Form der ganzen Kurve an die Dissoziationsrestkurve eines Ampholyten denken. Das undissoziierte Fermentmolekül ist aktiv.

Die Wirkung der X-Substanz lässt die Lage der Kurve, die

den rechten Teil der pH-Aktivitätskurve des gereinigten Ferments darstellt und einen typischen Verlauf der Dissoziationskurve von $pK\ 4.8$ zeigt, unberührt, aber die Lage des linken Schenkels kann durch die Anwesenheit der X-Substanz verändert werden. Der linke Schenkel der pH-Aktivitätskurve stellt sich wie eine Dissoziationsrestkurve einer Base dar. In je höherem Grade sich die Menge der vorhandenen X-Substanz vermehrt, desto stärker wird die Lage dieser Basendissoziationsrestkurve nach der weniger sauren Seite hin verschoben. Die Dissoziationskonstante als Base wird nämlich vergrößert. Da die Optimen aber durch die Kreuzung der beiden Kurven bedingt werden und die eine Kurve ihre spezifische Lage ($pK=4.8$) beibehält, wird die Lage des Optimums um so weniger zur sauren Seite verschoben, je mehr X-Substanz vorhanden ist und gleichzeitig erreicht die absolute Fermentaktivität bei jedem neuen Optimum einen entsprechend verminderten Betrag. Darum wirkt das Ferment bei alkalischer Reaktion praktisch nicht mehr. Man kann nun die optimale Acidität dieses Ferments beliebig verändern.

Man definiert vorläufig als die relative Einheit der X-Substanz diejenige Menge, welche das Optimum des gereinigten Ferments von pH 3 wieder auf pH 5.6 zurückbringt. $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, und 1 Einheit der X-Substanz verursachen die Verschiebung des Optimums zu pH 4.5, 5.0 resp. 5.5. Fermentsaktivität ist in den Optimen entsprechend ungefähr 60, 30 resp. 20% des gereinigten Ferments bei pH 3.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Als Glycerophosphatase diente Takadiastase. Befreiung von X-Substanz wurde nach Kobayashis Angabe wie folgt ausgeführt. 10 g Takadiastase wurden in dem Gemisch von 50 ccm M/2 Acetat Puffer (Essigsäure 7.2 ccm, Natr. Acetat 42.8 ccm) und 200 ccm Wasser gelöst, und nach dem Zusatz mit 50 g Kaolin wurde die Lösung auf der Maschine 1 Stunde geschüttelt. Kaolin wurde dann abzentrifugiert und, nachdem es 2 Mal mit 250 ccm Wasser,

das 50 ccm des oben erwähnten Puffers enthielt, gewaschen war, mit dem Gemisch von 50 ccm M/2 Acetat Puffer (Essigsäure 17.4 ccm + Natr. acetat 32.6 ccm) und 200 ccm 2%iger Natr. Glycerophosphat (Kahlbaum) versetzt und unter bisweiligem Schütteln 3 Stunden in einem Wasserbad von 37°C angestellt. Die Elution des Ferments war nun vollständig. Die von dem Kaolin abfiltrierte Lösung wurde im Kollodiumsack 2 Tage gegen destilliertes Wasser dialysiert und auf 500 ccm mit Wasser nachgefüllt. Der Fermentgehalt entspricht also 2%iger Lösung des Rohmaterials.

Die Darstellung der Lösung von X-Substanz wurde nach Kobayashi ausgeführt. 10 g Takadiastase wurden in 500 ccm Wasser gelöst und auf dem kochenden Wasserbad 1 Stunde erhitzt. Die von dem koagulierten Eiweiss abfiltrierte Lösung wurde dann mit 10%iger Bleiacetatlösung versetzt, bis kein Niederschlag mehr entstand. Der Niederschlag wurde scharf abgesaugt und in 200 ccm Wasser suspendiert und mit H₂S entbleit. Das erworbene Filtrat wurde mit CO₂ durchleitet und auf 250 ccm verdünnt. Da das Ferment und die X-Substanz in dem Rohmaterial definitionsgemäss in äquivalenter Menge vorhanden sind, besitzt die erhaltene Lösung der X-Substanz die doppelte Konzentration der hergestellten Fermentlösung, wenn etwaige Verluste während der Herstellung vernachlässigt werden.

Substrat war Natr. Glycerophosphat von Kahlbaum.

Der Fermentversuch wurde bei 37° im Wasserbad fortgeführt, und die abgespaltete anorganische Phosphorsäure wurde nach Briggs colorimetrisch bestimmt. 10 ccm der Versuchslösung wurden mit 2 ccm 20%iger Trichloressigsäure versetzt, und der aliquote Teil davon diente zur P-Bestimmung. In den Protokollen ist der Gehalt des anorganischen Phosphors in 0.833 ccm der Versuchslösung in mg angegeben.

Als Pufferlösung wurde hauptsächlich M/2 Essigsäure und Natr. Acetat gebraucht. Eine Acidität, die mit diesem Puffergemisch nicht regulieren kann, wurde mit dem Gemisch von Gly-

kokoll und Salzsäure hergestellt. pH wurde gleich nach Anstellung des Versuchs elektrisch ermittelt.

Versuch I.

Das Verhalten des gereinigten Ferments gegen die Wasserstoffzahl wurde zuerst untersucht. Die Versuchslösung bestand aus

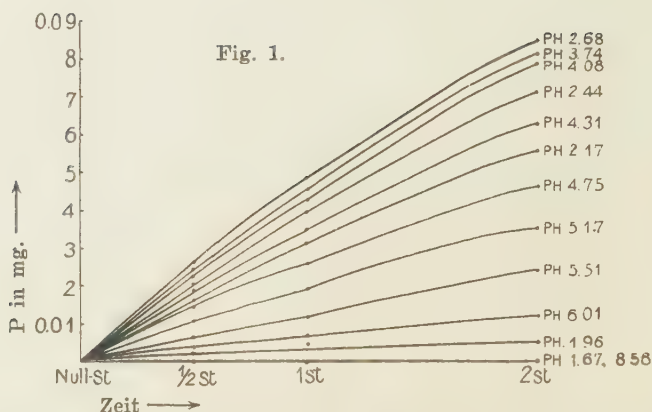
0.5 % Glycerophosphat	25 cem
Fermentlösung	10 cem
Puffer	10 cem
Wasser	5 cem

Das Resultat wird in Tabelle I und Figur 1 angegeben.

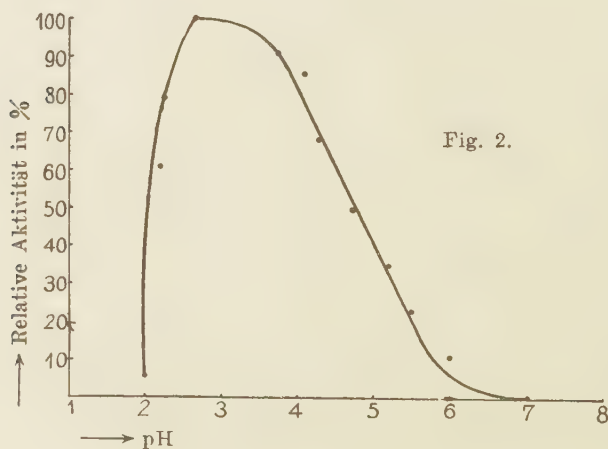
TABELLE I.

pH	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	2 St.	Relative Aktivität
1,67	0,0000	0,0000	0,0000	0
1,96	0,0025	0,0042	0,0053	6
2,17	0,0160	0,0313	0,0550	61
2,44	0,0200	0,0390	0,0700	79
2,68	0,0263	0,0480	0,0840	100
3,74	0,0240	0,0450	0,0800	91
4,08	0,0221	0,0425	0,0780	86
4,31	0,0180	0,0340	0,0620	69
4,75	0,0148	0,0253	0,0460	50
5,17	0,0102	0,0190	0,0343	35
5,51	0,0061	0,0117	0,0240	23
6,01	0,0031	0,0060	0,0120	11
8,58	0,000	0,0000	0,0000	

Das Ferment wirkt nun bei pH 2.68 optimal. Es ist sehr bemerkenswert, dass die Glycerophosphatase nach der Reinigung solch einen Sprung der optimalen Acidität, wie von pH 5.6 zu pH 3.0 erfahren hat. Man kann die Fermentwirkung bei pH 2.68



als 100% setzen und die relative Aktivität bei anderer Acidität aus der Figur 1 nach der Regel berechnen, dass die Zeit bis zum bestimmten Hydrolysegrad umgekehrt proportional zu der Aktivität ist. Die erhaltene Zahl wurde in der Tabelle I hinzugefügt. pH-Aktivitätskurve, Fig. 2, wird damit erhalten. Über diese Kurve wurde schon oben diskutiert. Dieses Ergebnis wurde schon früher von Kobayashi vermutet und ist jetzt verwirklicht worden.



Versuch 2.

In den folgenden Versuchen habe ich den Einfluss der X-Substanz auf diese pH-Aktivitätskurve untersucht. Da diese Substanz die Fermentwirkung in mehr saurer Reaktion hemmt, wurde die Konzentration des Substrats erhöht, um den Hydrolysegrad genauer miteinander zu vergleichen. Ich habe in dem vorliegenden Versuch zuerst als Kontrolle mit der neu hergestellten Fermentlösung ohne Zusatz mit der X-Substanz ihre Aktivität geprüft.

Die Versuchslösung bestand aus

2% Natr. glycerophosphat.....	25 ccm
Fermentlösung	10 ccm
Puffer	10 ccm
Wasser	5 ccm

Das Resultat ist in Tabelle II und Figur 3 zu sehen.

Fig. 3.

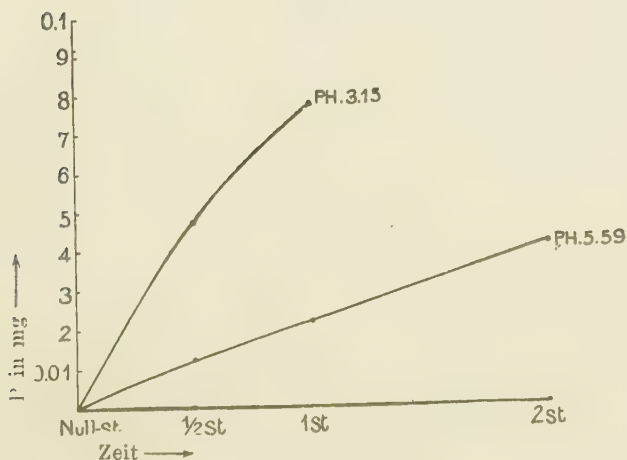


TABELLE II.

pH \ Zeit	½ Std.	1 Std.	2 Std.	Relative Aktivität
3.15	0.0475	0.0770	—	100
5.59	0.0117	0.0214	0.0416	24

Versuch 3.

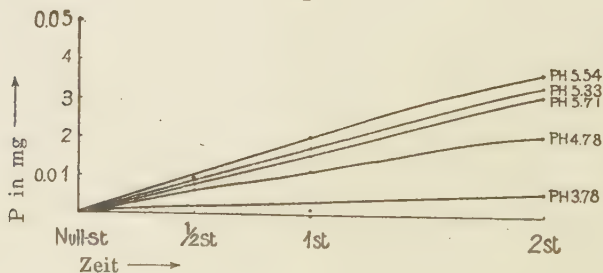
In diesem Versuche wurde die Fermentlösung mit der als Äquivalent angenommenen Menge von der X-Substanz gemischt. Versuchsanordnung ist wie folgt.

2% Natr. Glycerophosphat	25 ccm
Fermentlösung	10 ccm
Puffer	10 ccm
Lösung der X-Substanz	5 ccm

TABELLE III.

pH \ Zeit	½ Std.	1 Std.	2 Std.	Relative Aktivität
3.78	0.000	0.0010	0.0060	3
4.78	0.0060	0.0115	0.0215	11
5.33	0.0080	0.0175	0.0335	18
5.54	0.0090	0.0200	0.0365	20
5.71	0.0075	0.0155	0.0315	16

Fig. 4.



Das Resultat sieht man in Tabelle 3 und Fig. 4. Das ursprünglich vorhandene anorganische Phosphor in der zugesetzten X-Substanz wurde in diesem und folgenden Protokollen schon abgezogen angegeben.

Der Einfluss der X-Substanz ist auffallend. In pH 5.54 wirkt das Ferment in fast gleichem Betrag, wie in pH 5.59 bei dem Versuch 2 ohne Zusatz, aber die Erhöhung der Acidität des Mediums setzt nun die Aktivität stark herab. Wie erwartet, verhält sich das gereinigte Ferment nach der Vermischung mit der äquivalenten X-Substanz wie die unbehandelte Fermentlösung.

Versuch 4.

Die Konzentration der X-Substanz wurde weiter zur Hälfte vermindert. Die Versuchslösung war wie beim vorigem Versuch zusammengesetzt. Tabelle IV und Figur 5 gibt das Resultat an.

TABELLE IV.

Anorganisches Phosphor in mg.

pH	½ Std.	1 Std.	2 Std.	Relative Aktivität
3.17	0.0051	0.0111	0.0215	12
3.76	0.0063	0.0125	0.0240	14
4.43	0.0124	0.0250	0.0460	26
4.96	0.0154	0.0320	0.0605	34
5.17	0.0131	0.0290	0.0585	31
5.54	0.0107	0.0220	0.0430	24

Versuch 5.

Die Lösung der X-Substanz wurde auf das 4 fache mit Wasser verdünnt und 5 ccm davon wurden zur Fermentlösung versetzt. Versuchsanordnung wie früher.

Das Resultat veranschaulicht Tabelle V und Figur 6.

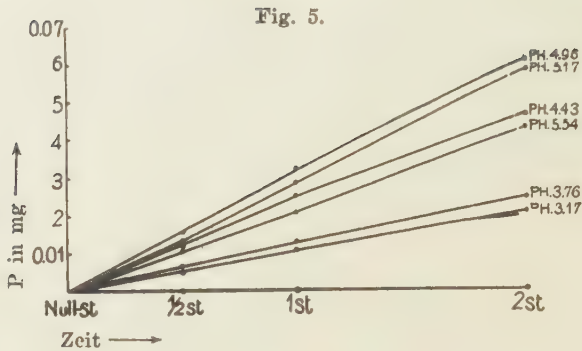
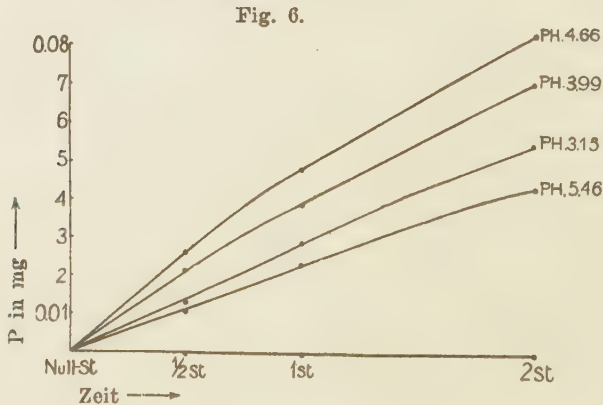


TABELLE V.

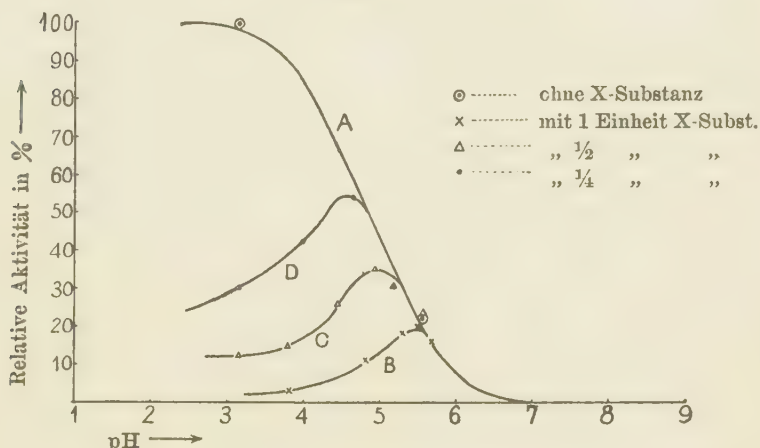
pH \ Zeit	1/2 Std.	1 Std.	2 Std.	Relative Aktivität
3.15	0.0135	0.0283	0.0548	30
3.99	0.0211	0.0398	0.0708	42
4.66	0.0260	0.0485	0.0825	54
5.46	0.0114	0.0232	0.0432	24



Wollen wir die Werte in dem Koordinatensystem zeichnen, die relative Aktivität auf der Ordinate und pH auf der Abszisse nehmend (Fig. 7).

Die Aktivität des Ferments ohne X-Substanz bei pH 3.15 wurde als 100% angenommen. Die daraus ausgerechnete relative Aktivität bei variierender Acidität ohne und mit X-Substanzzusatz in verschiedenen Konzentrationen ist in jeder Tabelle in der letzten Spalte zu sehen.

Fig. 7.



Die Punkte bei dem Ferment ohne X-Substanz fallen selbstverständlich auf die Dissoziationsrestkurve A von pK 4.8. Die anderen, jedem Versuch angehörenden Punkte stellen die B, C und D Kurve dar. Der Verlauf der Kurven ist typisch. Jeder rechte Schenkel ist mit der A-Kurve überdeckt. Die linken Schenkel sind die Teile der sich parallel verlaufenden Kurven, welche sich ja gegen A-Kurve im umgekehrten Sinne, wie Dissoziationsrestkurve der Basen, verlaufen und durch die Erhöhung der Konzentration der X-Substanz nach der weniger sauren Seite hin verschoben werden. Die Lage der rechten Schenkel bleibt aber unverändert.

Versuch 6.

Wie erwähnt, enthielt die X-Substanzlösung eine bedeutende Menge von anorganischem Phosphor. Ihr Gehalt war 0.6 mg in 1 ccm. Es musste also untersucht werden, ob die eigentümliche Wirkung der X-Substanz mit diesem Phosphat irgend etwas zu tun habe. In dem folgenden Versuch wurde die Konzentration des zuzusetzenden Phosphats so gewählt, wie die darin vorhandene Phosphormenge 0.6 mg pro 1 ccm betrug.

2% Natr. Glycerophosphat	25 ccm
M/2 Essigsäure-Acetat Puffer ..	10 ccm
Kaliumphosphat (0.6 mg P in 1 ccm)	5 ccm
Gereinigtes Ferment	10 ccm

TABELLE VI.

pH	½ Std.	1 Std.	2 Std.
3.88	0.0255	0.0485	0.0800
4.16	0.0215	0.0395	0.0770
4.30	0.0200	0.0370	0.0715
5.71	0.0110	0.0195	0.0365

Die Kontrolle ohne Zusatz mit Kaliumphosphat ergab die folgende Zahl.

TABELLE VII.

pH \ Zeit	½ Std.	1 Std.	2 Std.
2.71	0.0186	0.0358	0.0720
3.15	0.0290	0.0540	0.0850
3.84	0.0260	0.0450	0.0821
5.59	0.0120	0.0218	0.0425

Die in diesem Versuch gebrauchte Fermentlösung war nicht ganz frei von der X-Substanz, wie der Kontrollversuch zeigte. Aber man kann wohl sehen, dass das Phosphat in der Menge, wie in der X-Substanzlösung enthalten, auf die Fermentaktivität ohne Einfluss geblieben war.

LITERATUR.

Inouye, K. (1927): J. Biochem. **7**, 433.

Kobayashi, H. (1927): J. Biochem. **8**, 205.

DIE KATAPHORESE DER GLYZEROPHOSPHATASE.

Von

HIDEO KOBAYASHI.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Director: Prof. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 6. September 1928.)

Das Verhalten des Ferments im elektrischen Feld wurde schon früher von einigen Autoren untersucht. Aber das Experiment unter Berücksichtigung der Acidität der Lösung wurde zuerst von Michaelis unternommen. Dieser (1909, 1910, 1911) bestimmte die elektrische Ladung der Fermentteilchen durch den Überführungsversuch. Hefeinvertin wanderte rein anodisch auch in stark saurerer Lösung, dagegen war die Malzamylase positiv in saurerer Reaktion und negativ in alkalischer Reaktion geladen. Trypsin erlitt die Änderung im Sinne der Wanderung bei $h\ 1.35 \times 10^{-4}$. Pepsin wanderte im Bereich von $h\ 9.9 \times 10^{-3}$ bis 1.24×10^{-3} nach Anoden und Kathoden und sollte von amphoterischer Natur sein.

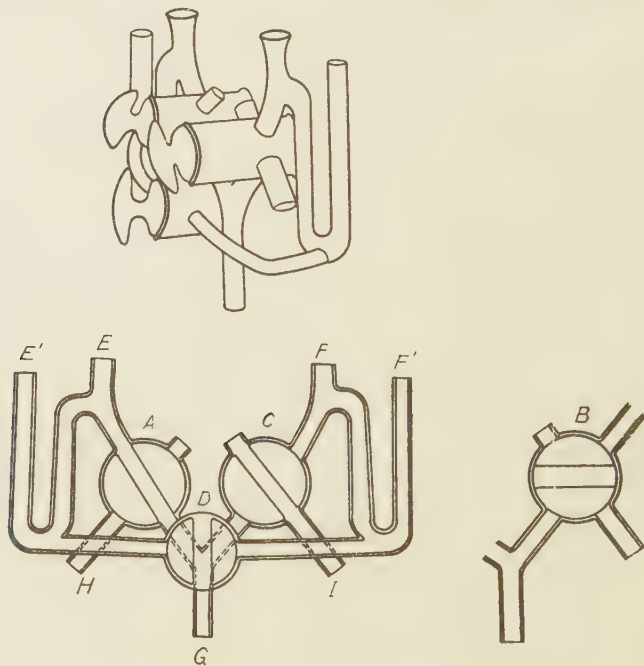
Pekelharing und Ringer (1911) haben den Versuch mit auf verschiedenen Wegen dargestellten Pepsinpräparaten wiederholt und dabei die Wanderung des Ferments zur Anode auch in starker Acidität beobachtet. Sie führten darum die kathodische Wanderung des Pepsins in saurerer Reaktion von Michaelis (1910) auf die beigemengten Albumosen und Peptone zurück. Dieses Resultat stimmt mit der Angabe von Northrop (1922) überein, der das Verhalten des Pepsins bei Membrangleichgewicht untersuchte und den Schluss zog, dass das Pepsin vielleicht ein einwertiges Anion ist.

Der Befund von Pekelharing zeigt, dass die elektrische Überführung des Fermentteilchens durch andere Substanz in der Lösung beeinflusst wird.

In der vorigen Mitteilung (1927) habe ich den Wirkungs-

mechanismus der Glycerophosphatase aus *Aspergillus oryzae* angegeben. Dieses Ferment hat die optimale Acidität bei pH 5.56. Aber wenn es nach der Adsorptionsmethode gereinigt wird, verschiebt sich das Optimum zu pH 4.2 oder sogar zu noch weit saurerer Reaktion. Das scheinbare Optimum des unreinen Ferments wird durch Vorhandensein der sogenannten X-Substanz verursacht, deren Eigenschaften auch da diskutiert wurden. Da die Wirkung der Glycerophosphatase mit der elektrochemischen Natur des Substrats nichts zu tun hat, muss die oben erwähnte Beeinflussung der X-Substanz auf das Ferment gezogen werden. Wenn dies der Fall ist, ist es interessant zu untersuchen, welches elektrische Verhalten die Glycerophosphatase einnimmt einmal mit und einmal ohne diese X-Substanz.

Ein Kataphoresenapparat wurde zu dem Zweck von neuem



eingerrichtet. Er ist im Prinzip derselbe wie die Apparate von Landsteiner-Pauli (1908) und Szent-Györgyi (1923). Die Konstruktion des Apparats wird in der Abbildung veranschaulicht.

In der Mitte des Armes von dem Y-förmigen Teile liegt beiderseits je ein kräftiger Glashahn. Der Lumen dieser Hähne hat dasselbe Kaliber wie der übrige Teil des Gefässes und dient zur Aufnahme des durch den Strom überführten Ferments. In der Stellung A ist das ganze Mittelgefäss durchgängig. Wenn die Hähne zu der Stellung B gedreht werden, ist ihr Lumeninhalt ganz abgesperrt, und wenn sie noch weiter bis zu C verstellt werden, kann der Inhalt durch den Fortsatz (H, I) herausgegossen werden. Die Hähne zu der Stellung wie C eingestellt, und das ganze Apparat umgekehrt, dann die Versuchslösung von G gefüllt. Die untere Hälfte des Y-förmigen Teils wird also ganz gefüllt und das Gummirohr an G wird mit dem Metallhahn fest gedrückt. Der Apparat wird nun in der richtigen Stellung, wie in der Abbildung, auf einem Stativ senkrecht und fest fixiert. Die Lumen der beiderseitigen Hähne werden, mit dem Daumen den unteren Fortsatz schliessend, mit der Seitenflüssigkeit gefüllt, und die Hähne werden zur Stellung wie B gedreht. Nun wird die Seitenflüssigkeit von E und F gefüllt, und mittels des Hahnes D wird das Niveau ausgeglichen. Elektroden sind aus Kupferkupfersulfat und werden mit dem Überführungsgefäss bei E' und F' mittels der Kaliumchlorid-Agar Brücke, nach der Angabe von Michaelis, verbunden. Hahn D wird dann geschlossen. Die beiderseitigen Hähne werden nun zur Stellung A gedreht, und die Vorbereitungen zum Versuche sind fertig. Der Stromkreis wird dann geschlossen. Die elektrische Spannung ist 100–110 Volt. Stromstärke ist 0.001–0.006 Ampère. Nach vollendeter Stromdurchleitung werden die Hähne A und B zur Stellung wie C gedreht, und die herausströmende Lösung wird zur Ermittlung des Fermentgehalts untersucht. 2 cem der Lösung wird mit dem Gemisch von 25 cem 2% Natrium Glycerophosphat, 10 cem M/2 Acetatpuffer und 13 cem

Wasser versetzt und in den Brutschrank von 37° gestellt. pH der Versuchslösung war 5.5–5.6. Nach 24–96 Stunden, wie bei der Anmerkung der Protokollen angegeben, werden 10 ccm der Versuchslösung herauspipettiert und das anorganische Phosphat wird mit Uranlösung titriert. 1 ccm dieser Uranlösung entspricht 0.0052 g P_2O_5 . Als Glycerophosphatase wurde Takadiastase gebraucht. Gereinigte Fermentlösung wurde nach dem Kaolin- oder Tonerdeverfahren dargestellt.

Die X-Substanzlösung wurde aus der inaktivierten Rohfermentlösung nach der Bleiacetatmethode erhalten. Genaue Angabe ist in der vorigen Mitteilung zu finden.

Die Acidität der Fermentlösung, mit der der Überführungsapparat gefüllt wurde, wurde durch Zusatz von Essigsäure-Acetatgemisch oder Salzsäure-Glykokollpuffer verändert. Zu 20 ccm der oben erwähnten Fermentlösung kamen 4 ccm des Puffers. 0.5 g Rohrzucker wurden ausserdem darin gelöst, um das spezifische Gewicht der Lösung etwas zu erhöhen. Die Seitenflüssigkeit war von gleicher H-Ionenkonzentration aus demselben Puffer, nämlich die 5 fach verdünnte Pufferlösung. Das Mischungsverhältnis musste ein wenig durch die puffernde Wirkung der Fermentlösung variiert werden.

EXPERIMENT I.

Zuerst wurde Kataphorese mit Rohferment (Takadiastase) ausgeführt. Konzentration war 1%. Die Lösung enthält Glycerophosphatase, aber diese ist noch mit X-Substanz verunreinigt. In diesem Zustand ist das Optimum des Ferments bei pH 5.56. Das Verhalten dieses Rohferments im elektrischen Feld ist wie folgt:

Dauer der Strom- leitung	pH	Überführungsrichtung		Anmerkung
		Anode	Kathode	
2 Stunden	4.0	0.0 cem	3.37 cem	nach 96 Stunden
5 „	5.77	2.80 „	0.0 „	„ „
3 „	6.56	3.80 „	0.0 „	„ „

Das Ferment wandert an der alkalischen Seite der optimalen Acidität anodisch, aber wenn diese Acidität überschritten, und die Lösung noch angesäuert wird, ändert sich der Wanderungssinn zur Kathode.

EXPERIMENT II.

In der vorigen Mitteilung wurde angegeben, dass das Rohferment von der X-Substanz befreit werden kann, wenn es bei pH 7.0 mit Tonerde behandelt wird. Fermentlösung (1) wurde wie früher aus 1 g Präparat dargestellt und auf 100 cem verdünnt. Fermentlösung (2) wurde nach der Tonerdebehandlung gegen destilliertes Wasser 2 Tage dialysiert und dann auf 200 cem verdünnt. Diese X-Substanzfreien Fermentlösungen haben Optimum bei pH 3–4. Der Überführungsversuch mit diesen Fermentlösungen ist wie folgt:

Versuch mit Fermentlösung (1).

Dauer der Strom- leitung	pH	Überführungsrichtung		Anmerkung
		Anode	Kathode	
4 Stunden	3.86	3.00 cem	0.0 cem	nach 24 Stunden
3½ „	5.30	3.00 „	0.0 „	„ „
4 „	6.78	2.60 „	0.0 „	„ „

Versuch mit Fermentlösung (2).

Dauer der Strom- leitung	pH	Überführungsrichtung		Anmerkung
		Anode	Kothode	
5 Stunden	3.85	1.90 cem	0.0 cem	nach 24 Stunden
5 „	5.45	2.00 „	0.0 „	„ „
5 „	6.50	1.60 „	0.0 „	„ „

In der ganzen Strecke von pH 3.8 bis 6.7 wandert das Ferment zur Anode.

EXPERIMENT III.

X-Substanzfreie Fermentlösung kann am bequemsten mittels Kaolinsorption und darauffolgender Elution durch Substrat gewonnen werden. Solche Lösung wurde wie früher aus 1.0 g Präparat dargestellt und auf 100 cem verdünnt.

Das Ergebnis mit dieser Fermentlösung ist dasselbe wie das im Experiment II.

Dauer der Strom- leitung	pH	Überführungsrichtung		Anmerkung
		Anode	Kathode	
5 Stunden	3.98	0.80 cem	0.0 cem	nach 24 Stunden
3½ „	5.50	2.10 „	0.0 „	„ „
4 „	6.68	1.12 „	0.0 „	„ „
4 „	3.00	1.50 „	0.0 „	„ „

EXPERIMENT IV.

Tonerdeadsorptionsrestlösung aus 2 g Material wie im Experiment II wurde auf pH 4.0 angesäuert und mit Kaolin geschüttelt, bei pH 5-6 durch Glycerophosphat eluiert, 2 Tage gegen destilliertes Wasser dialysiert und auf 200 cem verdünnt. Mit dieser Lösung wurde die anodische Wanderung des Ferments wieder nachgewiesen.

Dauer der Strom- leitung	pH	Überführungsrichtung		Anmerkung
		Anode	Kathode	
5 Stunden	3.84	1.00 ccm	0.0 ccm	nach 96 Stunden
5 „	5.40	0.90 „	0.0 „	96 „
3½ „	6.50	1.80 „	0.0 „	24 „

EXPERIMENT V.

Wie in der vorigen Mitteilung beschrieben, wirkt die X-Substanz auf das Ferment und zwar schiebt seine optimale Acidität von pH 3-4 zu 5.6. Diese Substanz ist eiweissfrei und geht durch eine Kollodiummembran hindurch. Welchen Einfluss sie auf die elektrische Ladung des Fermentteilchens ausübt, wurde darauf untersucht.

In diesem Experiment habe ich zuerst die kathodische Wanderung des Ferments bei pH 4 beobachtet. Das Ergebnis hatte mich zu der Annahme geführt, dass sich das gereinigte Ferment im elektrischen Felde, wenn es mit der X-Substanz zusammen vorhanden ist, wie sich das nicht gereinigte Ferment verhält. Es wurde aber nachher durch wiederholte Versuche gefunden, dass das Ergebnis von irgendeiner Verunreinigung verursacht worden war, und dass das Ferment, wenn es einmal gereinigt wird, mit oder nicht mit der X-Substanz gemengt, noch immer nach der Anode wandert.

Bei dem oben erwähnten Verhalten des nicht gereinigten Ferments handelt es sich also nicht um die Wirkung der darin vorhandenen X-Substanz, sondern um ihren grossen Eiweissgehalt, wie ich andererseits beobachten konnte, dass sich das gereinigte Ferment nach dem Zusatz von Eiweiss (Eieralbumin) genau wie das nicht gereinigte Ferment im elektrischen Felde verhält.

Ich bin aber trotzdem der Meinung, dass die Glycerophosphatase in ihrer Natur ein Ampholyt ist, und ihre undissoziierten Moleküle enzymatisch wirksam sind.

Inouye (1928) hat kürzlich die Glycerophosphatase soweit gereinigt, dass das pH-Optimum nun in pH 3 vorhanden war. Die pH-Aktivitätskurve dieses gereinigten Ferments hatte eine typische Form und liess an die Dissoziationsrestkurve eines Ampholyten denken. Der linke Schenkel, der zu der Kationdissoziationsrestkurve gehört, fiel etwas steil nach der sauren Seite, aber der andere Schenkel, der dagegen zu der Aniondissoziationsrestkurve gehört, war nicht anders als eine Dissoziationsrestkurve von $pK_a = 4.8$. Durch die X-Substanz wurde die pH-Aktivitätskurve so verändert, als ob die Lage des linken Schenkels, d. h. der Kationdissoziationsrestkurve, nach der weniger sauren Seite verschoben würde, während die Aniondissoziationsrestkurve ihre Lage unverändert beibehielt. Diese letzte Kurve war spezifisch für die Takaglycerophosphatase. Die X-Substanz wirkte also wie die Kationdissoziationskonstante des Fermentampholyten vergrössernd. Das habe ich schon in meiner zweiten Mitteilung besprochen.

Der oben erwähnte Kataphoresenversuch ergab aber, dass die wirkliche Vergrösserung der Kationdissoziationskonstante durch die X-Substanz nicht stattgefunden hat.

Die Erklärung davon wird wie folgt gegeben.

Die pH-Aktivitätskurve ist die Dissoziationsrestkurve des Fermentampholyten. Sie wird durch die Grösse der Anion- und Kationdissoziationskonstanten des Ferments bedingt. Die Aniondissoziationskonstante ist bestimmt und spezifisch für dieses Ferment. Die Kationdissoziationskonstante selbst wird auch durch die X-Substanz nicht verändert. Aber durch die Bindung der X-Substanz an die Kation des Fermentampholyten wird die Kationdissoziationskurve so verändert, als ob ihre Dissoziationskonstante vergrössert würde. Darüber hat sich Michaelis (1920) bei der Erwägung der Dissoziation des Ampholyten unter wahrer Salzbildung ausgesprochen. Hier in unserem Fall handelt es sich um die wahre Salzbildung der basischen Gruppe des Ferments mit der X-Substanz, deren wirksamer Anteil hinsichtlich ihrer

Darstellungsmethode als elektronegativ geladen angesehen werden kann.

Salzbildung des Ferments mit irgendeinem Kation ist hier belanglos. Sie mag stattfinden, aber die Dissoziation des Salzes ist vollständig, und die Dissoziationskonstante des Ferments hat damit gar nichts zu tun.

Die elektrochemische Natur des Ampholyten selbst wird, wie Michaelis sagte, bei wahrer Salzbildung nicht verändert, und in diesem Fall ist die Acidität des Dissoziationsrestmaximums nicht identisch mit dem isoelektrischen Punkt. Die Überführungsrichtung des Ferments wird also durch die X-Substanz nicht verändert.

LITERATUR.

- Inouye, K., (1928); Journ. of Biochem. **10**, 51.
Kobayashi, H., (1927); Journ. of Biochem. **8**, 205.
Landsteiner, u. Paulic., (1908); 25. Kongr. g. inn. Med., Wien, **57**,
Michaelis, L., (1909, i); Biochem. Zeitschr. **16**, 81.
Michaelis, L., (1909, ii); Biochem. Zeitschr. **17**, 231.
Michaelis, L., (1910); Biochem. Zeitschr. **28**, 1.
Michaelis, L., (1911); Biochem. Zeitschr. **30**, 481.
Michaelis, L., (1920); Biochem. Zeitschr. **108**, 225.
Northrop, J. H., (1922); Journ. of general physiol. **4**, 635.
Pekelharing, C. A. M., u. Ringer, W. E., (1911); Zeitsch. Physiol.
Chem. **75**, 282.
Szent-Györgyi, A. V., (1923); Biochem. Zeitschr. **139**, 74.

ÜBER DIE NIERENGLYCEROPHOSPHATASE.

Von

KATSURA ASAKAWA.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Director: Prof. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 6. September 1928.)

Der Abbau der Glycerophosphorsäure durch die Phosphatase ist von Interesse nicht nur darum, dass das Substrat sich als ein Baustein von Lecithin und Kephalin darstellt, sondern auch darum, dass das Ferment andere Phosphorsäureester in derselben Weise angreifen kann. Es kommt zuerst der Phosphorsäureester der Hexose, von dessen Bedeutung bei dem Hexosenabbau und der Glykogensynthese vielleicht nichts zu sagen übrig bleibt. Dass die fermentative Spaltung der Hexose- oder Glycerophosphorsäure mit dem Ossifikationsprozess in innigem Zusammenhang steht, ist doch erwähnenswert. Die vor kurzem mitgeteilte Angabe von Kay und seinem Mitarbeiter (1925, 1926) über die Phosphatasenwirkung auf das Kasein und seine Abbauprodukte ist von besonderer Bedeutung, weil dieses Eiweiss dem Säugetiere im ersten Lebensjahr als wichtiges Nährmaterial zur Verfügung steht.

Über die Glycerophosphatase aus *Aspergillus oryzae* haben schon Kobayashi (1927, 1928) und Inouye (1928) eingehende Studien ausgeführt. Dieses Ferment wirkt optimal bei pH 3, und bei Anwesenheit einer dritten Substanz, der X-Substanz, wird das Optimum zu pH 5.6 verschoben, der optimalen Acidität des ungereinigten Ferments. Die pH-Aktivitätskurve dieses Ferments zeigt sich als eine typische Dissoziationsrestkurve von pK 4.8. Kobayashi und Inouye haben die Art und Weise des Einflusses der X-Substanz untersucht.

Ich habe nun die Nierenglycerophosphatase als Gegenstand des Experiments gewählt. Die Fermentlösung wurde zuerst nach

Robison (1924) dargestellt. Die frische Schweinsniere, welche direkt aus dem Schlachthaus kam, wurde von dem anhaftenden Fettgewebe abpräpariert, mit der Maschine zerhackt und mit einem Glas im Mörser zerstoßen. Der Organbrei wurde mit Chloroformwasser von 10 fachem Gewicht des Organs 24 Stunden in den Eisschrank gestellt und dann filtriert. Die so hergestellte Fermentlösung war aktiv, doch stark getrübt und enthielt vor allem noch eine reichliche Menge von Eiweiss und Elektrolyte. Was bei dem Experiment mit dieser Fermentlösung unangenehm war, war ihr recht grosser Gehalt an anorganischem und dem mit der Zeit abspaltbaren organisch gebundenen Phosphat. Als diese Phosphorsäure durch Dialyse weggeschafft werden sollte, fiel eine eiweissartige Substanz aus, die das Ferment mitriss. Der Niederschlag hat aber die Wiederlöslichkeit eingebüsst, und ausserdem konnte das Ferment daraus unter verschiedenen Bedingungen nicht ausgezogen werden. Ich wollte anfangs das Ferment aus der Lösung durch Adsorptionsmethode von dem labilen Eiweisskörper befreien. Kaolin und Tonerde adsorbierten bei verschiedener Acidität ein fast vollständiges Quantum des Ferments, aber die Elution ging nur mit sehr ungenügender Ausbeute vonstatten, sowohl ohne als auch mit dem Glycerophosphat bei variierender Wasserstoffzahl.

Eine neue Herstellungsmethode musste also ausgesucht werden. Ich habe die frische Schweinsniere mit der Maschine zerhackt und mit Seesand im Porzelmörser fein gemahlen. Der Organbrei wurde mit Wasser von 10 fachem Gewicht des Organs versetzt und bei 37°C der Autolyse überlassen. Bakteriellen Infektionen wurde mit Chloroform und Toluol vorgebeugt. Nach 2 Tagen wurde das Autolysat mit Eisessig angesäuert, bis das blaue Lackmuspapier sich schwach rötete, und noch einen Tag in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Nun war die Flüssigkeit durchsichtig und konnte von der auf der oberen Schicht schwebenden flockigen Masse leicht und klar abfiltriert und gegen destilliertes Wasser 2 Tage dialysiert werden, ohne merklichen Niederschlag zu

erzeugen. Die so bekommene Fermentlösung war hoch aktiv und vollkommen klar, schwach gelblich gefärbt, und frei von anorganischem Phosphor. Bei dem Experiment bildete sich nur eine spärliche Phosphorsäure aus der Fermentlösung selbst. Die Fermentlösung konnte im Eisschrank, mit Toluol überdeckt wochenlang unverändert aufbewahrt werden.

Da diese Fermentlösung (A) während des Experiments bei dem Versuch der Reinigung mittels der Adsorptionsmethode, wie unten mitgeteilt wird, ganz verbraucht wurde, mussten die Versuche teils mit einer anderen Fermentlösung (B) ausgeführt werden. Die Herstellungsmethode war dieselbe, aber an Wirksamkeit war das Ferment selbstverständlich verschieden.

Die Ergebnisse des Experiments mit diesem Ferment werden unten angegeben. Das Substrat war Natr. glycerophosphat von Kahlbaum und wurde einmal umkristallisiert. Seine fermentative Hydrolyse wurde bei 37°C im elektrisch regulierten Wasserbad ausgeführt. Die Substratlösung und die Pufferlösung wurden zusammen mit der nötigen Menge von Wasser, um das Gesamtvolum der Versuchslösung bei dem nachherigen Zusatz mit der Fermentlösung zu einem bestimmten zu machen, 10 Minuten bei 37° vorerwärmt. Gleichzeitig wurde die Fermentlösung 5 Minuten in demselben Wasserbad erwärmt. Der Moment der Mischung der beiden Lösungen wurde als Null-Stunde vermerkt. Die abgespaltete anorganische Phosphorsäure wurde nach Briggs colorimetrisch bestimmt. Dabei muss man darauf achten, dass man nach dem Zusatz des Molybdänreagens und Hydrochinons zu dem Trichloressigsäurefiltrat genau 5 Minuten warten muss, bevor eine weitere Vermischung mit der Sulfitlösung erfolgt. Die Sulfitlösung muss frisch sein. Bei Nichtbeachtung dieses Umstandes ergab die Phosphorsäure bei Anwesenheit einer grossen Menge organisch gebundener Phosphorsäure colorimetrisch einen geringeren Betrag als die wirklich vorhandene Menge.

In den Protokollen bedeuten die Zahlen Phosphor in mg in 1 ccm der Versuchslösung. Pufferlösungen waren M/2 Essigsäure

und M/2 Natr. Acetat oder M/10 Glykokoll und M/10 NaOH, je nach dem Bedarf, pH elektrometrisch.

Versuch 1.

Die Kinetik der Nierenphosphatase wurde bisher nur wenig untersucht. Kay (1926) hat bei Schweins-, Ratten- und Menschenniere pH 8.8–9.2 als Optimum gefunden. Von der Konzentration des Substrats und der Dauer des Versuchs wurde aber in seiner Mitteilung nichts angegeben. Erdtman (1927) hat sich der Angabe von Kay hinsichtlich des Optimums angeschlossen.

Ich habe mit der oben erwähnten klaren Fermentlösung die pH-Abhängigkeit untersucht. Die Versuchslösung bestand, wie folgt, aus

M/100 Natr. Glycerophosphat	6 cem
M/10 Glykokoll-Natronlaugepuffer	15 cem
Fermentlösung	6 cem
Wasser	33 cem

Die Konzentration des Substrats war also schliesslich M/1000. Das Resultat wird in der Tabelle I und Figur 1 angegeben.

TABELLE I.

pH	Zeit.		
	½ Std.	1 Std.	2½ Std.
7.23	0.0041	0.0080	0.020
7.83	0.0090	0.0170	0.0310
8.33	0.0163	0.0253	0.0310
8.67	0.0225	0.0295	0.0310
8.90	0.0245	0.0310	0.0312
9.10	0.0253	0.0310	0.0311
9.22	0.0246	0.0310	0.0311
9.42	0.0233	0.0305	0.0312
9.50	0.0210	0.0271	0.0313
9.61	0.0135	0.0181	0.0275
11.04	0.0008	0.0010	—

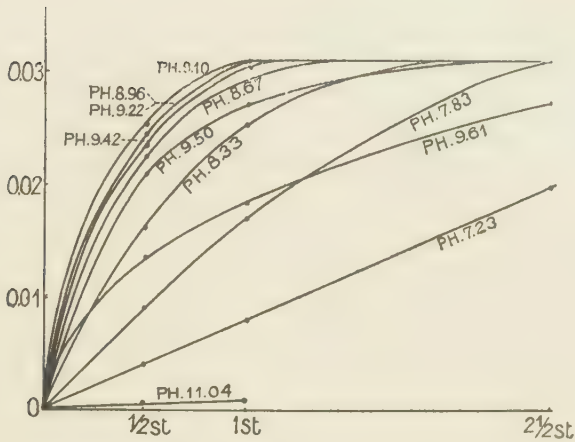


Fig. 1.

Das pH-Optimum der Nierenphosphatase ist unter diesen Bedingungen bei pH 9.1 vorhanden. Das Resultat stimmt also mit der Angabe von Kay überein. Diese optimale Acidität ist aber nicht manifest. Sie ist veränderlich nach dem Fermentpräparat. Der mit der Fermentlösung (B) ausgeführte Versuch ergab sich wie folgt. Die Versuchsanordnung wie früher.

TABELLE II.

pH	Zeit.		
	$\frac{1}{2}$ Std.	1 Std.	$2\frac{1}{2}$ Std.
7.79	0.0099	0.0134	0.0163
8.46	0.0179	0.0208	0.0234
8.53	0.0189	0.0233	0.0289
8.88	0.0222	0.0277	0.0297
9.14	0.0119	0.0153	—

In diesem Resultat ist auffallend, dass das Ferment bei pH 9.14 bedeutend schwächer wirkt. Man sieht eine noch bessere Wirkung bei pH 8.88. In dem vorstehenden Versuch war das Ver-

hältnis umgekehrt. Jedenfalls kann man wohl pH 8.9–9.1 als Optimum ansehen. Aber was beachtet werden muss, ist die Verschiedenheit der optimalen Acidität nach der Fermentlösung. Es musste in die Fermentkinetik ein dritter Faktor eingeklebt werden, dessen Wirkung in folgenden Versuchen analysiert wurde.

Versuch 2.

Die Fermentmenge wurde in geometrischer Reihe mit den abgespalteten Phosphorsäure untersucht.

Die Fermentmenge wurde in geometrischer Reihe mit den Quotienten $\frac{1}{2}$ vermindert, und die Wirkungen auf das Substrat wurden miteinander verglichen. Sonst war die Versuchslösung zusammengesetzt wie bei dem vorigem Versuch, und die endliche Konzentration des Substrats war M/1000. Die Fermentlösung (B). pH der Lösung wurde durch Pufferung als 8.86–8.88 festgestellt. Das Resultat wird unten tabellarisch angegeben.

TABELLE III.

Fermentlösung	anorganischer Phosphor in mg.		
	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	$2\frac{1}{2}$ St.
unverdünnt	0.0225	0.0270	0.0306
$\frac{1}{2}$ verdünnt	0.0176	0.0227	0.0278
$\frac{1}{4}$ verdünnt	0.0116	0.0175	0.0237

Man sieht, dass die Zeit bis zum bestimmten Hydrolysegrad der Fermentkonzentration umgekehrt proportional ist.

Versuch 3.

Die gereinigte Takaphosphatase, das Ferment aus *Aspergillus oryzae*, hat das Optimum bei pH 3. Bei der alkalischen Reaktion wie pH 9, dem Optimum des Nierenferments, ist eine Wirkung wohl nicht zu erwarten. Da wir nun doch wissen, dass dieses pflanzliche Ferment unter dem Einfluss einer dritten Substanz eine falsche optimale Acidität zeigen kann, muss entschieden

werden, ob das Nierenferment durch eine solche Beimengung ein anderes Optimum als das der für das Ferment spezifischen Acidität vorspiegelt. Wenn dies der Fall wäre, und die Fermente der Niere und *Aspergillus oryzae* denselben aktiven Kern gemeinsam besäßen, so müsste das Gemisch der beiden Fermentlösungen die optimale Wirkung bei einer Acidität zwischen pH 3 und pH 9 ausüben. Das Experiment ergab aber, dass das nicht der Fall war.

Ich habe die Takaphosphatase nach der Methode von Kobayashi und Inouye gereinigt. Das Reinigungsverfahren ist aus ihrer Beschreibung zu ersehen. Diese Fermentlösung hatte folgende Wirkung.

M/100 Natr. Glycerophosphat	6 cem
M/2 Essigsäure-Acetat Puffer	15 cem
Taka-phosphatase	20 cem
Wasser	19 cem

TABELLE IV.

pH	anorganischer phosphor in mg.		
	½ Std.	1 Std.	2½ Std.
2.80	0.0171	0.0228	0.0306
3.06	0.0168	0.0225	0.0303
5.01	0.0095	0.0152	0.0248
6.03	0 0035	0.0060	-

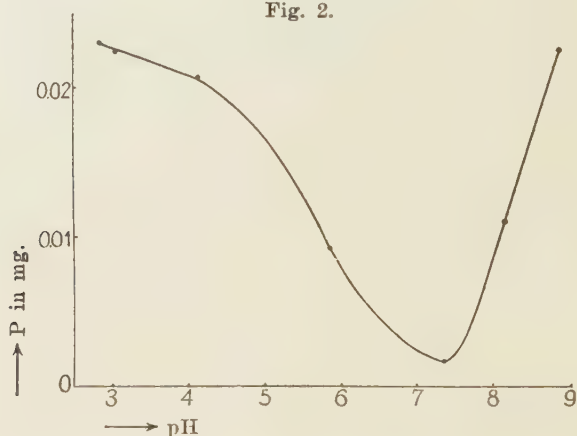
Man sieht, dass 20 cem Taka-Phosphatase bei pH 2.8 und 3 cem Nierenphosphatase (B) bei pH 8.88 (s. Tabelle II) fast dieselbe Aktivität zeigen. Ich habe darum folgenden Versuch angestellt.

M/100 Natr. glycerophosphat	6 cem
M/2 Essigsäure-Acetat oder	
M/10 Glykokoll-Natronlauge Puffer.	15 cem
Taka-Phosphatase	20 cem
Nierenphosphatase (B)	3 cem
Wasser	16 cem

TABELLE V.

pH	2.83	3.05	4.17	5.87	7.36	8.11	8.83
Anorganischer Phosphor in mg. 1 St.	0.0230	0.0225	0.0207	0.0092	0.0017	0.0110	0.0225

Fig. 2.



Beide Fermente wirkten ganz unabhängig von einander, und zwar bei jeder optimalen Acidität in demselben Betrag, wie sie einzeln gewirkt hatten.

Natr. Fluorid hemmt die Taka-Phosphatase selbst in sehr verdünnter Konzentration, aber auf die Nierenphosphatase übt es keinen Einfluss aus. Beim Zusatz von 10 ccm 0.05N NaF zu oben erwähnter Versuchslösung wurden noch 0.0256 mg P bei pH 8.37 und 0.0224 mg P bei pH 9.23 in 2½ Stunden abgespalten. Zusatz 20 ccm Glycerin von 25% hatte auch keinen Einfluss auf das Nierenferment. Man hat hier also zwei ganz verschiedene Fermente zu einem so einfachen Substrat, wie Glycerophosphat, hergestellt. Das eine wirkt optimal bei pH 3 und, wenn es noch unrein ist, bei pH 5.6. Das andere hat dagegen sein Optimum bei pH 9.1. Das erinnert an das Verhältnis der drei Proteasen,

nämlich Pepsin, Papain und Trypsin-Kinase. Nach Waldschmidt-Leitz und seinen Mitarbeitern haben diese 3 Proteasen gemeinsamen Angriffspunkte bei dem genuinen Eiweiss, wie es schön bei der stufenweisen enzymatischen Hydrolyse des Histons (Waldschmidt-Leitz und Künstler, 1927) nachgewiesen wurde. Nach der Anschauung von Northrop (1923) und Willstätter (1924) hängt die Verschiedenheit der optimalen Acidität bei den drei Proteasen mehr von der elektrochemischen Natur des Eiweisses als von der des Ferments ab. Die Dissoziationskonstante der Glycerophosphorsäure wurde für die zweite Stufe von Kobayashi (1926) als pK 6.1 ermittelt. Nach der Angabe von Meyerhof (1926) ist pK für die zweite Stufe 6.3 und für die erste 1.4. Die pH -Abhängigkeit unserer zwei Glycerophosphatasen hat keinen Zusammenhang mit dem Dissoziationszustand des Substrats. Die gründliche Verschiedenheit dieser zwei Fermente muss also der Natur des Ferments selbst zugeschrieben werden. Wir sind nun der Meinung, dass das eigentümliche Verhalten des Pepsins, des Papains und der Trypsin-Kinase nicht von dem Dissoziationszustand des Substrats, sondern von den Eigenschaften der aktiven Fermente selbst bedingt ist.

Versuch 4.

In dem Versuch 1 habe ich die pH -Abhängigkeit der Nierenglycerophosphatase untersucht. Man sieht an dem Resultat, besonders deutlich an der dazugehörenden Figur 1, dass die Fermentwirkung in der mehr alkalischen Reaktion als Optimum (pH 9.1) eine Hemmung zu erleiden scheint. Davon wird weiter unten die Rede sein. In jenem Versuch I war die Konzentration des Substrats sehr verdünnt, und in der Nähe der optimalen Acidität wurde schon $\frac{1}{2}$ Stunde beinahe 80% des vorhandenen Substrats angegriffen. Es kam dazu noch die oben erwähnte abnorme zeitliche Herabsetzung der Fermentwirkung bei pH 9.5–9.6. Es darf darum nicht beliebig aus diesen Kurven die relative Geschwindigkeit ausgerechnet werden. Aber in der Höhe von $\frac{1}{3}$ Hydroly-

sengrad kann sie doch schätzungsweise ermessen werden. Die Zahlen werden in der Tabelle VI angegeben.

TABELLE VI.

pH	7.23	7.83	8.33	8.67	8.90	9.10	9.22	9.42	9.50	9.61	11.04
Relative Aktivität in %	6	15	39	68	88	100	90	77	53	31	2

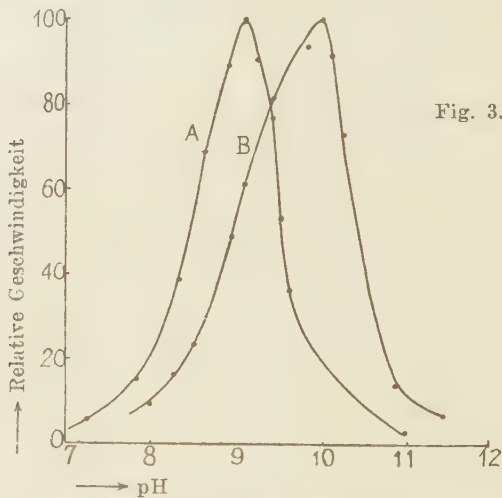


Fig. 3.

Hier wurde die Aktivität bei pH 8.33 und pH 9.61 einerseits und bei pH 8.67 und 9.42 andererseits gleich angesetzt, wie es der Verlauf der Kurven andeutet. Es mag aber in beiden Fällen die der letzten noch vergrößert werden. Die so erhaltene pH-Aktivitätskurve wurde als A in der Figur 3 gezeichnet. Wir haben bei der Taka-Phosphatase den eigentümlichen Einfluss des Paralytators kennen gelernt, dass sich die Lage der optimalen Acidität nach der beigemischten Menge der X-Substanz in verschiedener Weise verschieben kann. Daraus folgt die Annahme, dass das nach meiner Methode hergestellte Nierenferment, obwohl schon von der bedeutenden Menge von Eiweiss und Elektrolyte befreit, doch mit

einer Substanz angehaftet ist, die aber ihrer Natur nach ganz anders als die X-Substanz bei der Taka-Phosphatase sein soll, wie ich bei Versuch 3 schon klargestellt habe. Ich wollte zwar anfangs das Nierenferment durch die Adsorptionsmethode reinigen, habe aber immer grosse Schwierigkeiten bei der Elution des Ferments angetroffen und daher auf die weitere Reinigung verzichtet. Man kann die Ursache der oben erwähnten abnormen zeitweisen Herabsetzung auch der Inaktivierung durch die hohe Alkalizität zuschreiben. Es ist allgemein anerkannt, dass das Ferment überhaupt bei dem Vorhandensein des Substrats einer ungünstigen Acidität widersteht. Ich habe darum beim folgenden Versuch die Konzentration des Substrats stark erhöht. Das Resultat war auffallend.

M/10 Natr. Glycerophosphat	20 cem
M/10 Glykokoll-NaOH Puffer	15 cem
Wasser	10 cem
Nierenphosphatase (A)	5 cem

Die Konzentration des Substrats betrug schliesslich M/25.

TABELLE VII.

pH	Anorganischer Phosphor in mg.			Relativ Aktivität in %
	½ Std.	1 Std.	2½ Std.	
8.27	0.0095	0.019	0.0460	16
8.50	0.0135	0.0290	0.0760	24
8.65	0.0198	0.0405	0.106	34
8.90	0.0293	0.0592	0.144	49
9.09	0.0372	0.0742	0.175	62
9.45	0.0480	0.0950	0.211	81
9.80	0.0555	0.106	0.217	94
9.97	0.0595	0.117	0.229	100
10.02	0.0595	0.117	0.229	100
10.10	0.0545	0.106	0.206	91
10.25	0.0432	0.0845	0.183	72
10.85	0.0075	0.0105	0.0120	13
11.37	0.0040	0.0050	0.0050	7

Ich habe denselben Versuch mit der anderen Fermentlösung (B), welche vor 6 Monaten hergestellt worden war und diesmal neu dialysiert wurde, ausgeführt. Die Versuchsanordnung war dieselbe wie früher. Die Fermentwirkung war schwach.

Fig. 4.

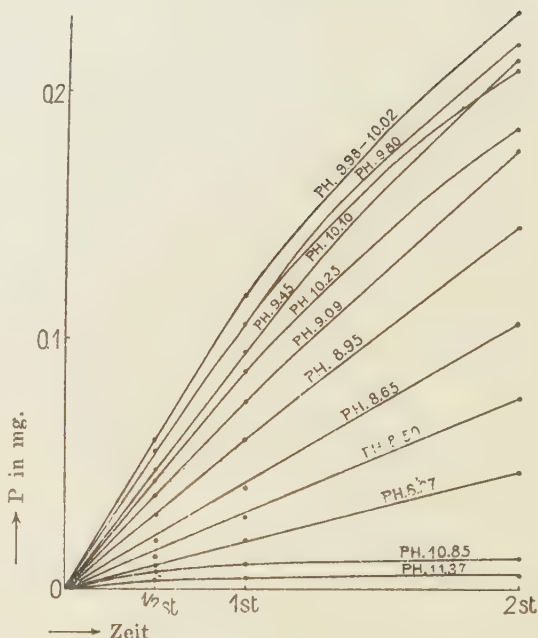
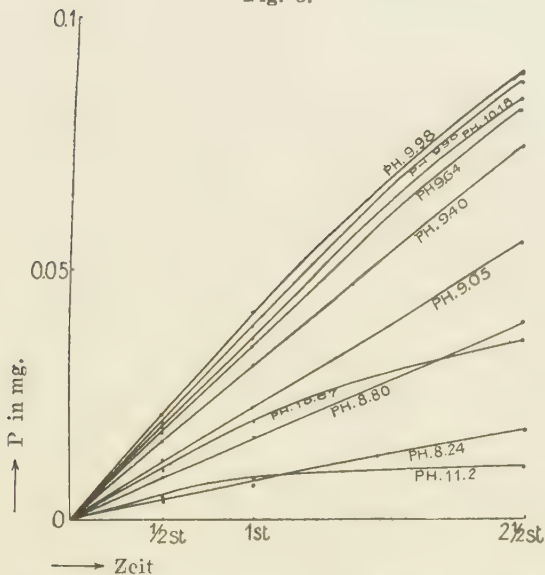


TABELLE VIII.

pH	Anorganischer Phosphor in mg.			Relative Aktivität in %
	½ Std.	1 Std.	2½ Std.	
8.24	0.00355	0.00692	0.0180	13
8.80	0.00817	0.0165	0.0392	37
9.05	0.0118	0.0221	0.0555	53
9.40	0.0155	0.0310	0.0747	74
9.64	0.0177	0.0348	0.0822	84
9.90	0.0199	0.0385	0.0880	94
9.98	0.0210	0.0412	0.0902	100
10.18	0.0187	0.0367	0.0845	89
10.67	0.0095	0.0200	0.0360	44
11.2	0.0040	0.0080	0.0105	17

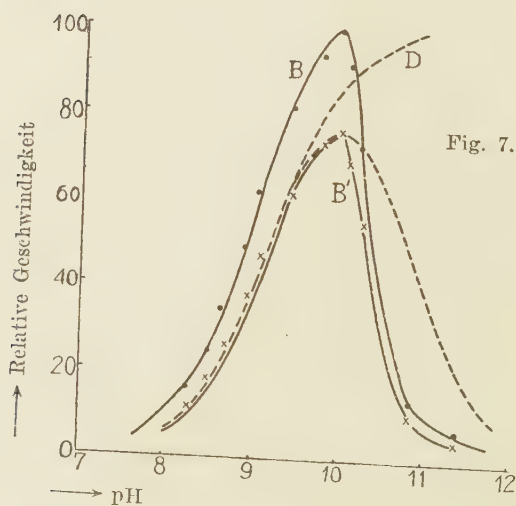
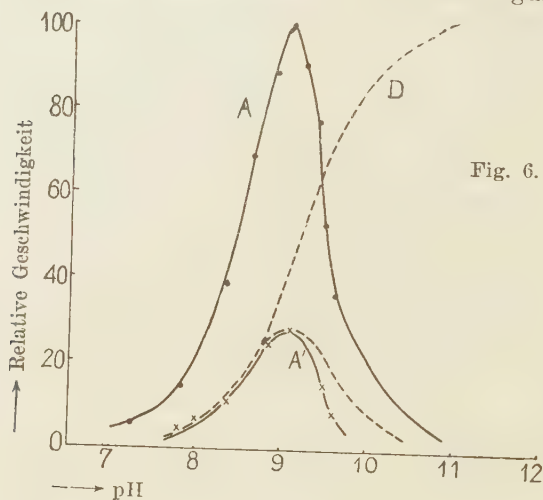
Fig. 5.



Das Resultat ist auch in Figur 5 zu sehen. Das Optimum ist nun in pH 10 vorhanden, und seine Verschiebung kann wohl durch die schützende Wirkung des Substrats von hoher Konzentration erklärt werden. Aber eine andere Möglichkeit ist nicht ausgeschlossen, dass nämlich die dritte Substanz durch die gesteigerte Konzentration des Substrats nach der Massenwirkung der Bindung mit dem Ferment mehr oder weniger abgedrängt wird und folglich eine neue optimale Acidität zutage tritt.

Jedenfalls stellen wir auf Grund dieses Ergebnisses (Versuch 4, Tabelle VI), wie früher, die pH-Aktivitätskurve her. Die ausgerechnete relative Aktivität wurde an der letzten Spalte der Tabelle VIII angegeben. Die B-Kurve in Figur 3 zeigt den Verlauf. Bei dieser Kurve stehen die beiden Schenkel auch ziemlich steil an beiden Seiten aber etwas milder als bei der Kurve A, und das Verhältnis erinnert uns an den Fall bei der Taka-Phosphatase. Die linken Schenkel der beiden Kurven A und B scheinen mir im wesentlichen zu den gleichen Kurven zu gehören.

Die Neigung dieser beiden linken Schenkel sind doch noch ziemlich steil, und sie haben in diesen Formen mit keiner theoretisch annehmbaren Kurve etwas zu tun. Wir wollen also die Höhe der Punkte der Kurven A und B um 72 resp. 24% herabsetzen. Nun kommen die Kurven A der Figur 6 und B der Figur 7 zustande:



Der Neigungswinkel des linken Schenkels der Kurve B in der Ordinatenhöhe von 50% Aktivität, den die Dissoziations- oder ihre Restkurve theoretisch erlangt, ist nun beinahe 71 Grad. Der Punkt auf der Kurve von 50% Aktivität entspricht pH 8.2. Die Dissoziationskurve von pK 8.2 wird in den Figuren als D eingetragen.

Wir nehmen weiter die Natur der Nierenphosphatase als Ampholyte an, deren Basendissoziationskonstante sich als $pK_b = 14 - 9.2 = 4.8$ sich darstellt. Dann sind die Kurven A und B die des Dissoziationsrestgrads (ρ), und die Gipfel der Kurven pH 10 resp. 9.1 folglich die maximalen Restgrade. Man kann der Dissoziationskonstante als Säure die Werte pK 10.8 resp. 9.0 zuschreiben, und zwar mittels der Rechnung $10.0 + (10.0 - 9.2)$ und $9.1 - (9.2 - 9.1)$. Mit diesen Werten kann man die Dissoziationsrestkurve nach folgender Formel graphisch, darstellen.

$$\rho = \frac{1}{1 + \frac{K_a}{h} + \frac{K_b \cdot h}{K_w}}$$

Diese theoretischen Kurven A' und B' werden in Figuren mit punktierter Linie eingeschrieben. Die maximalen Dissoziationsrestgrade sind 28 resp. 76%.

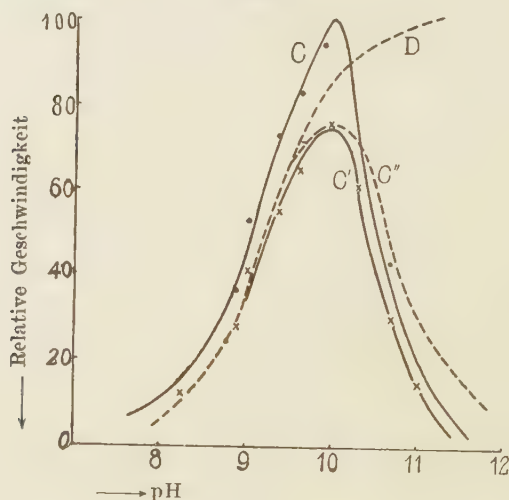
Auf Grund dieser Ergebnisse kann man wohl annehmen, dass die Kationdissoziationsrestkurve von pK 4.8, die ihrer Form nach mit der Dissoziationskurve einer Säure von pK 9.2 identisch ist, für die Nierenphosphatase spezifisch ist. Die sie kreuzende Aniondissoziationsrestkurve ist je nach den Bedingungen veränderlich, aber da das pH-Optimum durch die Kreuzung der beiden Kurven bedingt wird, ist die Lage der optimalen Acidität entlang jener für die Nierenphosphatase spezifische Kurve verschiebbar, soweit die Inaktivierung des Ferments durch die Alkalizität nicht überhand nimmt.

Das Ergebnis des Versuchs 4, Tabelle VIII, ergab die pH-Aktivitätskurve C in Fig. 8. pK wird nun als 4.8 angenommen.

Da das pH-Optimum 10 ist, wird pK wieder als 10.8 bestimmt. Die aus diesen beiden Dissoziationskonstanten berechnete Dissoziationsrestgradkurve zeigt die punktierte Kurve C'' in derselben Figur. Wenn die Punkte auf der Kurve C um 24% herabgesetzt werden, deckt sich die Kurve C' mit der theoretischen Kurve C''.

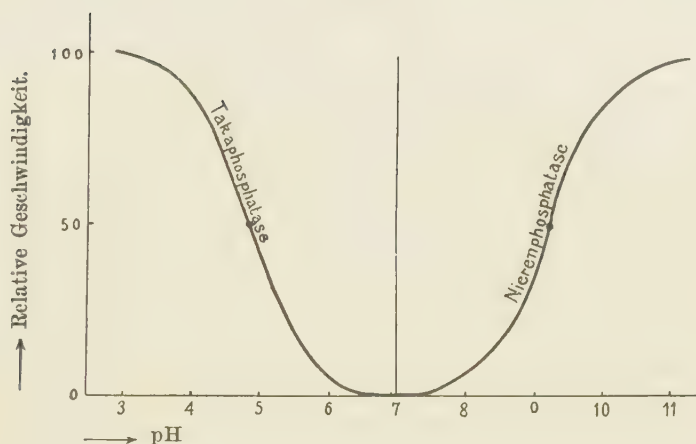
Man sieht eine stärkere oder schwächere Abweichung der Kurven A', B' und C' von der theoretischen Kurve auf der alkalischen Seite des Maximums. Dies wird vielleicht von der Inaktivierung des Ferments durch die hohe OH-Ionenkonzentration verursacht. Eine andere Möglichkeit wurde oben in Erwägung gezogen.

Fig. 8.



Was mich noch mehr interessiert, ist die Lage der für die Nierenphosphatase als spezifisch berechneten Kurve von pK 4.8. Die der Takaphosphatase eigentümliche Kurve wurde von Inouye als pK 4.8 ermittelt. Diese beiden Kurven sind also an den beiden Seiten des pH 7 symmetrisch, und stehen sich als Spiegelbilder gegenüber. Die nebenstehende Figur zeigt dieses Verhältnis.

Fig. 9.



Versuch 5.

Die Knochenphosphatase wurde eingehend von englischen Autoren untersucht. Robison und Soames (1924) haben unter ziemlich hoher Konzentration des Substrats das Optimum bei pH 8.4–9.4 gefunden. Die Bestimmung der abgespalteten Phosphorsäure wurde aber erst nach 18 Stunden ausgeführt. In so lang fortgesetzten Versuchen findet wohl eine Inaktivierung des Ferments durch die steigende Alkalizität statt und gestaltet die Resultate so verwickelt, dass man dann von einer Fermentkinetik nicht mehr reden kann. Martland und Robison (1928) haben später die Versuche auf eine kurze Zeitfrist beschränkt. Die Konzentration des Substrats war 0.1 M. Sie konnten nun am Anfang des Versuchs eine bessere Fermentwirkung bei pH 9.4 als bei pH 8.9 beobachten. Bei höher alkalischer Reaktion scheinen die Autoren eine abermalige Herabsetzung der Fermentwirkung beobachtet zu haben.

Ich konnte, wie erwähnt, bei der Nierenphosphatase zu dem auffallenden Ergebnis gelangen, dass die optimale Acidität dieses

Ferments in ausgesprochen hoher alkalischer Reaktion zu finden war, wenn Inaktivierung durch Alkalizität oder eine Hemmung durch irgendeinen dritten Faktor mittels der Steigerung der Substratkonzentration einigermassen ausgeschlossen wurde. Das war auch der Fall bei der Knochenphosphatase.

Die Knochenphosphatase wurde nach meiner oben erwähnten Methode hergestellt, und damit wurde das pH-Optimum bei variierender Substratsmenge untersucht. Mit M/1000 Endkonzentration des Substrats wirkt das Ferment, wie von englischen Autoren angegeben, bei pH 9. Aber als die Konzentration auf M/25 gesteigert wurde, verschob sich das Optimum wieder zu pH 9.9.

M/100 Natr. Glycerophosphat	5 ccm
M/10 Glykokoll-Natronlaugepuffer	15 ccm
Wasser	25 ccm
Knochenphosphatase	5 ccm

pH \ Zeit	1/2 Std.	2 1/2 Std.
8.67	0.0165	0.0264
9.02	0.0175	0.0289
9.65	0.0125	0.0183

M/10 Natr. Glycerophosphat	20 ccm
M/10 Glykokoll-Natronlaugepuffer	15 ccm
Wasser	10 ccm
Knochenphosphatase	5 ccm

pH \ Zeit	1/2 Std.	1 Std.	2 1/2 Std.
9.50	0.0255	0.0420	0.0950
9.70	0.0276	0.0435	0.103
9.85	0.0293	0.0480	0.110
10.05	0.0260	0.0420	0.084

Mit der Hodenphosphatase des Schweins, die auch nach meiner Methode hergestellt wurde, ergab das Experiment ein Resultat in demselben Sinne.

LITERATUR.

- Erdtman, H. (1927); Zeits. f. Physiol. Chem. **172**, 182.
Inouye, K. (1928); Journ. of Biochem. **10**, 51.
Kobayashi, H. (1926); Journ. of Biochem. **6**, 261.
Kobayashi, H. (1927); Journ. of Biochem. **8**, 205.
Kay, H. D. (1926); Biochem. Journ. **20**, 791.
Martland, M. and Robison, R. (1927); Biochem. Journ. **21**, 665.
Meyerhof, O. und Suranyi, J. (1926); Biochem. Zeitschr. **178**, 427.
Northrop, J. H. (1923); Journ. of General Physiol. **5**, 263.
Rimington, . and Kay, H. D. (1926); Biochem. Journ. **20**, 777.
Robison, R. and Soames, K. M. (1924); Biochem. Journ. **18**, 740.
Waldschmidt-Leitz, E. und Künstler, G. (1927); Zeits. f. Physiol. Chem. **171**, 290.
Willstätter, R. und Grasmann, W. (1924); Zeits. f. Physiol. Chem. **138**, 184.

STUDIES ON EXPERIMENTAL RICKETS.

II. The Influence of Ultra-violet Irradiation on the Antirachitic Value of Soybean Oil.

By

SEIICHI IZUME, YOSHINORI YOSHIMARU
AND ISAO KOMATSUBARA.

*(From the Central Laboratory of the South Manchuria Railway Co.,
Dairen, Manchuria).*

(Received for publication, September 23, 1928.)

INTRODUCTION.

The purpose of the present investigation was to determine the value of soybean oil for its antirachitic property and to ascertain whether its antirachitic value could be increased by means of irradiation with the ultra-violet light, and, furthermore, to see whether the phytosterol isolated from the unsaponifiable constituents of the oil could acquire the antirachitic property by irradiation.

Very few investigations concerning the antirachitic vitamin of soybean oil and its constituents have been reported in literatures. Heilbron, Kamm and Morton (1927) who examined the oil with the spectroscope were unable to detect the presence of ergosterol. Rosenheim and Webster (1927) also showed that both sitosterol and stigmasterol prepared from the crude sterols of soybean oil exhibited no characteristic absorption bands of ergosterol in the ultra-violet region, and they were not rendered antirachitic by exposure to ultra-violet rays. Scheunert (1927) reported, however, that both the "foots" and the technical phosphatide preparations of soybean oil were given the antirachitic property by means of irradiation.

Experimental.

I. THE METHODS.

Rickets were previously induced to young rats by placing them on the Steenbook diet no. 2965 for 5 weeks, and the substances to be tested were either incorporated with the diet, or daily fed to the rachitic animals which were receiving the same diet for the experimental period of 3 weeks.

For the diagnosis of the healing effect of test materials we relied on the evidence of the radiographs which were taken both before and after the experimental period as well as the histological examination of the distal ends of the tibia.

The ultra-violet irradiation of test materials was carried out by means of the quartz mercury vapor lamp (Original Hanau) usually for 30 minutes at a distance of 30 cm.

II. THE TEST MATERIAL.

A. *Soybean oil.*

The samples of soybean oil tested were the following six different preparations:

1. The crude oil obtained by the hydraulic press of round bean cake system with the application of about 250 pounds of pressure. (Crude oil, R. B.)
2. The same oil after refining with such processes as alkali washing, acid-clay bleaching, and deodorization with super-heated steam. (Refined oil, R.B.)
3. The crude oil produced with the hydraulic press of the Anglo-American system at a pressure of about 1,500 pounds. (Crude oil, A.A.)
4. The refined oil of same. (Refined Oil, A.A.)
5. The oil prepared by the benzine extraction method. (Oil, B.E.) and
6. The oil produced by extraction with alcohol. (Oil, A.E.)

B. The unsaponifiable matter and phytosterol of soybean oil.

The unsaponifiable matter was prepared from the crude soybean oil (R.B.) by extracting its saponification products with ether, and phytosterol was isolated from the non-saponifiable fraction according to the method of Matthes and Dahle (1911). Phytosterol, thus obtained, melted at $137-8^{\circ}$. It showed a brilliant bluish violet fluorescence which is very similar to that of ergosterol (1927) under the quartz mercury vapour lamp from which the visible rays were screened off by means of a special glass filter.

It also exhibited the well-marked absorption bands of ergosterol in the ultra-violet region when its ether solution was examined spectrographically. The intensity of those absorption bands of phytosterol at the dilution of 1:50 was nearly equivalent to that of ergosterol at the dilution of 1:20,000. It was, therefore, estimated that ergosterol was present in that specimen of phytosterol to the extent of about 0.25%.

III. RESULTS.

The results of the feeding experiments are summarized in the accompanying table.

DISCUSSION.

Our experimental results showed that the antirachitic value of refined soybean oil (both R.B. and A.A.) did not differ much from that of crude oil. The fact seems to indicate that the antirachitic principle in the oil is not appreciably removed or destroyed by such processes of refining as alkali washing, bleaching by means of acid-clay and deodorization by super-heated steam.

We proved that the alcohol extraction oil was the lowest in the antirachitic potency of all the oils we examined. This is probably due to the fact that vitamin D is more soluble in alcohol than in oil, and during the course of manufacture the greater part of it may be removed from the oil when the alcohol extract is subjected to cooling so as to separate the oil from the solution.

TABLE I.

Test material	Amount fed		Antirachitic effect	No. of rats used.
	Incorporated with diet	Daily per capita		
	%	mg.		
Crude oil, R.B.	20	—	+	2
	10	—	±	2
	5	—	—	2
Irradiated crude oil, R.B.	10	—	+	2
	5	—	+	2
	2.5	—	+	2
Refined oil, R.B.	20	—	+	2
	10	—	±	2
	5	—	+	2
Irradiated refined oil, R.B.	10	—	+	2
	5	—	+	2
	2.5	—	±	2
Crude oil, A.A.	20	—	+	2
	10	—	±	4
	5	—	—	2
Irradiated crude oil, A.A.	10	—	+	2
	5	—	+	3
	2.5	—	+	2
Refined oil, A.A.	20	—	+	2
	10	—	±	2
	5	—	—	2
Irradiated refined oil, A.A.	10	—	+	2
	5	—	+	2
	2.5	—	+	2
Oil, B.E.	20	—	±	4
	10	—	—	4
	2.5	—	—	2
Irradiated oil, B.E.	10	—	+	2
	5	—	±	4
	2.5	—	—	2
Oil, A.E.	20	—	—	2
	10	—	—	2
	5	—	—	2
Irradiated oil, A.E.	10	—	+	2
	5	—	+	4
	2.5	—	+	2

Unsapon. matter	0.2	—	—	2
	0.15	—	—	2
	0.1	—	—	2
	0.05	—	—	2
	—	6	—	2
Irradiated unsapon. matter	0.15	—	+	4
	0.1	—	+	2
	0.05	—	+	2
	0.025	—	+	2
	—	6	+	2
Phytosterol.	—	10	—	2
	—	5	—	2
Irradiated phytosterol.	—	5	+	2
	—	2	+	2
	—	1	+	2
	—	0.2	—	2

The antirachitic value of soybean oil was significantly increased by means of the irradiation with ultra-violet light, and, furthermore, the principle which gave this property was condensed in the phytosterol isolated from the non-saponifiable fraction of the oil. These results are in harmony with those of Hess, Weinstock and Helman (1925) and also of Steenbock and Black (1925) on other vegetable oils, like cottonseed, linseed and olive oils.

Although a number of investigators, such as, Klobb and Bloch (1907) Keimatsu (1911), Matthes and Dahle (1911) and Bonstedt (1928) carefully studied the constituents of the sterols of soybean oil yet no one seemed to have succeeded in proving the presence of ergosterol in the oil.

These experimental results of ours in which we showed that phytosterol of soybean oil acquired the antirachitic property when irradiated with the ultra-violet light and its ether solution exhibited the well marked absorption bands characteristic to ergosterol do strongly suggest the occurrence of ergosterol, the pro-vitamin D, in the oil.

It may be concluded from these facts that ergosterol is always present, although in a very small quantity in soybean oil, and it

is the compound which gives to the oil the property of acquiring the antirachitic potency by irradiation with the ultraviolet rays.

SUMMARY.

1. Among the soybean oils which we examined the oil produced by means of the hydraulic press was the highest and the oil prepared by extraction with alcohol was the lowest in antirachitic value, while the oil obtained with the benzine extraction method had intermediate value.

2. The antirachitic vitamin in the crude oil was not appreciably removed or destroyed by the usual processes of refining.

3. The antirachitic potency of the oil was significantly increased by means of irradiation with ultra-violet light.

4. Phytosterol isolated from the unsaponifiable fraction of the oil was rendered antirachitic by irradiation, and exhibited the well-defined absorption bands of ergosterol in the ultraviolet region.

REFERENCES.

- Bonstedt, K. (1928) *Z. physiol. Chem.*, **176**, 269.
Heilbron, I. M., Kamm, E. D. and Morton, R. A. (1927) *Biochem. J.*, **21**, 1279.
Hess, A. F., Weinstock, M. and Helman, F. D., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1924-5) **22**, 76. *J. Biol. Chem.* (1925) **63**, 305.
Keimatsu, S. (1911) *Chem. Zeit.*, **35**, 839.
Klobb, T. and Bloch, A. (1907) *Bull. soc. chim.* (4), **1**, 422.
Matthes, H. and Dahle, A. (1911) *Arch. Pharm.*, **249**, 424.
Rosenheim, O. (1927) *Biochem. J.*, **21**, 1335.
Rosenheim, O. and Webster, T. A. (1927) *Biochem. J.*, **21**, 389.
Scheunert, A. (1927) *Z. Untersuch. Lebensmittel.*, **54**, 302.
Steenbock, H. and Black, A. (1925) *J. Biol. Chem.*, **64**, 263.

ÜBER DAS VORKOMMEN DES β -STEARO-DIPALMITINS IN DER RINDERTHYMUS.

Von

JUNJI KARASHIMA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut in Nagasaki.

Vorstand: Prof. M. Tomita.)

(Eingegangen am 1. Oktober 1928.)

Auf vielen Wegen strebt die Forschung, die physiologische Bedeutung der Thymusdrüse genauer kennenzulernen. Das Aufsuchen von chemischen Bestandteilen ist dabei eine der wichtigsten Arbeitsmethoden.

Die Thymus ist ein sehr labiles Organ. Sie bildet sich zur Zeit der Geschlechtsreife zurück; doch bleiben auch noch nach der Involution Teile des Gewebes im Fette erhalten.

Um die Zusammensetzung des Thymusfettes zu ermitteln und zugleich um vergleichsfähiges Material für die Zusammensetzung der tierischen Fette herbeizuschaffen, wurde folgende Untersuchung vorgenommen. Dabei ist es uns gelungen, β -Stearo-dipalmitin in reinem Zustand leicht darzustellen.

I. DARSTELLUNG DES β -STEARO-DIPALMITINS.

Die vom Blut und der bindegewebigen Kapsel befreite Thymus eines frisch getöteten Rindes wird mittels eines starken Luftstromes getrocknet, welcher das auf einem Porzellanteller in dünner Schicht liegende Material bläst. Das getrocknete Material wird zu Pulver zermahlen, dann einer mehrfachen Menge reinen Acetons beigegeben und unter häufigem Umschütteln 24 Stunden lang stehen gelassen. Man saugt den in Aceton löslichen Teil ab und wäscht den Rückstand mehrmals mit Aceton. Nach Verdunsten des anhaftenden Acetons mittels eines Luftstromes, extrahiert man das Thymuspulver im Soxhlet-Apparat mit Äther. Die aus dem ätherischen Extrakt beim Abkühlen auf 0° sich ausscheidenden Krystalle

werden durch Dekantieren und Filtrieren abgetrennt. Die gesammelten Krystalle werden dann mit auf 45–50° erwärmtem 85%igem Alkohol aufgenommen. Bei Zimmertemperatur scheidet sich aus dieser Alkohollösung ein weisser mikroskopisch rosettenförmig angeordneter Nadelkrystall aus. Dieser Krystall wird 2mal aus 45°–50° erwärmtem absolutem Alkohol und dann aus warmem Aceton umkrystallisiert.

A. Eigenschaften.

Die Substanz ist in Äther, Petroläther, Benzin, Benzol, Toluol, Pyridin, Schwefelkohlenstoff und Chloroform leicht löslich. In Essigäther löst sie sich etwas schwerer. In kaltem Aceton und Äthyl-, Methyl- und Amylalkohol ist sie fast unlöslich. Bei gelinder Wärme wird sie aber mit den erwähnten Lösungsmitteln sehr leicht extrahiert. Sie schmilzt bei 59°. Unter bestimmten Bedingungen hat sie Doppelschmelzpunkte von 50° und 59°.

Stickstoff, Phosphor und Schwefel sind nicht nachweisbar. Cholesterinreaktion ist negativ.

B. Analyse.

I. Elementaranalyse.

0.2187 g Substanz gaben 0.6115 g CO₂ und 0.2444 g H₂O.

C ₅₃ H ₁₀₂ O ₈	Ber. C 76.19%	H 12.31%
	Gef. 76.26	H 12.19

II. Ermittlung der Verseifungszahl.

1.1043 g Substanz verbrauchten N/2 KOH 7.8 ccm.

Berechnet für ein Stearodipalmitin	201.6
Gefunden	198.5

Die Substanz zeigt weder Säurezahl noch Jodzahl.

C. Spaltungsprodukte.

Das aus diesem Glycerid durch Verseifung mit Kalilauge erhaltene Fettsäuregemisch hat den Schmelzpunkt von 56°.

Dieser Schmelzpunkt entspricht nach der von Heintz (1854) aufgestellten Tabelle einem Gehalt von 35% Stearinsäure und 65% Palmitinsäure. Auf diese Weise wird die angenommene Zusammensetzung ebenfalls bestätigt. Die Säurezahl dieses Fettsäuregemisches wurde geeicht.

0.5000 g Substanz verbrauchten N/2 KOH 3.75 ccm.	
Berechnet für ein Gemisch von 1 Mol. Stearinsäure	
und 2 Mol. Palmitinsäure	211.2
Gefunden	210.4

Um die Glycerin- und Fettsäuremenge zu bestimmen, wurden 5.3619 g Glycerid mit Natriumalkoholat nach Kossel und Obermüller (1890, 1891) verseift. Man erhält in bekannter Weise einerseits eine glycerinhaltige wässrige Lösung und andererseits eine ätherische Lösung von Fettsäuregemisch.

In glycerinhaltiger wässriger Lösung wurde der Glycerin-gehalt nach C. Mangold (1891) bestimmt.

5.3619 g Substanz verbrauchten N/5 KMnO ₄ 62.2 ccm.	
Glyceringehalt des Stearodipalmitins	Ber. 11.03%
	Gef. 10.67

Das Fettsäuregemisch wurde in bekannter Weise mit Natriumkarbonat verseift und dann mit essigsaurem Baryt in alkoholischer Lösung fraktioniert gefällt. Hierdurch erhielt man 12 Fraktionen von Barytseife. Jede Portion wurde gewogen und der Bariumgehalt bestimmt. Die gefundenen Zahlen sind in der nachstehenden Tabelle verzeichnet.

Die erste und zweite Fraktion haben wegen des Mitreissens von Bariumkarbonat etwas höheren Bariumgehalt. Die dritte bis sechste Fraktion stimmt mit stearinsäurem Barium in dem Bariumgehalt überein (Ba-gehalt des stearinsäuren Bariums 19.52%). Die weiteren Fraktionen entsprechen dem palmitinsäuren Barium (Ba-gehalt des palmitinsäuren Bariums 21.21%). Also erhält man aus dem Fettsäuregemisch ungefähr 43.7% Stearinsäure und

Ordnung der Fraktion	Gewicht der Barytseife	Ba-gehalt der Barytseife
1	0.1114 g	32.10 %
2	0.1720	22.78
3	0.2483	19.27
4	0.4239	18.52
5	0.4130	19.88
6	0.7896	19.50
7	0.4809	20.85
8	0.4932	21.38
9	0.5612	21.18
10	0.2080	21.16
11	0.0963	21.65
12	0.5730	21.60

56.3% Palmitinsäure (Berechnet für Stearodipalmitin 35.7% Stearinsäure und 64.3% Palmitinsäure).

Auf Grund des Schmelzpunktes und der bei den Elementaranalysen erhaltenen Zahlen des Glycerides und der Beschaffenheit der Spaltungsprodukte glaube ich, das aus dem Rinderthymus abgeschiedene Glycerid als β -Stearo-dipalmitin betrachten und mit dem von C. Amberger und K. Bromig (1922) synthetisch dargestellten β -Stearo- α , α' -dipalmitin für identisch halten zu dürfen.

II. BEZIEHUNG ZWISCHEN DER THYMUSALTERATION UND DEM GEHALT AN β -STEARO-DIPALMITIN.

Zur Erkennung der Beziehung zwischen der Thymusalteration und dem Glyceridgehalt wurden die aus 1–8 Jahre alten Rindern stammenden Thymus in 3 Arten klassifiziert. Das β -Stearo-Dipalmitin in jeder Klasse wurde durch die oben erwähnte Methode isoliert. Hieraus ergibt sich, dass die Thymusalteration immer von einer β -Stearodipalmitinvermehrung begleitet wird. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle verzeichnet.

Alterationsgrad des Ausgangsmaterials	β -Stearodipalmitingehalt im		
	frischen Material	getrockneten Material	gesamnten Fett
leichte Alteration	0.58%	2.53%	7.41%
mittelgradige Alteration	3.83	12.95	30.91
hochgradige Alteration	9.35	14.14	25.74

LITERATUR.

- Amberger, C. u. Bromig, K. (1922): Bioch. Z. **130**, 252.
Heintz (1854): Liebigs Ann. der Chem. **92**, 295.
Kossel u. Obermüller (1890): Z. physiol. Chem. **14**, 599.
" " (1891): Z. physiol. Chem. **15**, 321.
Mangold, C. (1891): Zitiert nach Hofmeister u. Lenz (1892): Z.
analyt. Chem. **31**, 718.

ZUR KENNTNIS DER VERGLEICHENDEN BIOCHEMIE.

IV. Über das Verhalten der Amidobenzoessäuren im Organismus der niederen Tiere.¹⁾

Von

TERUMI KAMEI.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut. Vorstand: Prof. M. Tomita
und der chirurgischen Klinik der medizinischen Fakultät
in Nagasaki. Vorstand: Prof. K. Koyano).

(Eingegangen am 1. Oktober 1928).

Analogieen der Vereinigung von Benzoessäure und Glykokoll zu Hippursäure wurden festgestellt für verschiedene substituierte Benzoessäuren. Im Widerspruch mit einer Angabe von Graebe und Schultzen (1867), nach welcher auch die Amido-benzoessäure mit Glykokoll sich paaren soll, hat nun E. Salkowski (1882) angenommen, dass *m*-Amidobenzoessäure im Organismus des Menschen, Hundes und Kaninchens zum Teil in Uramidobenzoessäure übergeht. Mitsuba und Ichihara (1927) haben kürzlich mitgeteilt, dass Anthranilsäure im Organismus des Kaninchens und Hundes teils in Uramidobenzoessäure übergeführt, teils mit Glukuronsäure gepaart und im Harn ausgeschieden wird. Andererseits haben schon Ellinger und Heusel (1914) behauptet, dass *p*-Amidobenzoessäure im Kaninchenorganismus zum Teil acetyliert wird.

Von den Gesichtspunkten ausgehend, dass typische, in den Geweben verlaufende chemische Umsetzungen ganz bestimmter Art bei verschiedenen Tierspecies in einigem Parallelismus mit den morphologischen Verschiedenheiten sich verhalten, wurden schon im hiesigen Institut die vergleichenden Untersuchungen über das Verhalten der aromatischen Fettsäuren im Organismus der niederen Tiere mehrfach ausgeführt (1926).

1) I, II u. III Mitteilungen vgl. Diese Zs. 5, 229, 6, 21, 6, 163.

Es schien mir nun von Interesse, noch das Verhalten verschiedener Amidobenzoesäuren im Organismus der Kaltblüter zu untersuchen, deren Vorkommen im Tierkörper zwar nicht erwiesen ist, die aber je nach der Stelle der Seitenkette verschiedene Beziehungen zu einigen Stoffwechselprodukten besitzen.

Darum habe ich eine Reihe von Fütterungsversuchen mit drei isomeren Amidobenzoesäuren an Fröschen und Schildkröten angestellt, deren Ergebnisse im folgenden mitgeteilt werden.

Experimentelle Belege.

A. ÜBER DAS VERHALTEN DER AMIDOBENZOE SäUREN IM ORGANISMUS DES FROSCHES.

1. Fütterung von *m*-Amidobenzoesäure.

Um den Harn ohne Verlust zu erhalten, wurde den Fröschen die Haut um den Anus mit einem Faden abgebunden und je 0,02–0,04 g *m*-Amidobenzoesäure als Natriumsalz subcutan injiziert. Der Harn wurde unter vermindertem Druck verdampft, mit heissem Alkohol ausgezogen, der alkoholische Auszug eingedampft und in Wasser gelöst. Um die sekundäre Spaltung der Umwandlungsprodukte zu vermeiden, wurde die wässrige Lösung mit Essigsäure, anstatt der Salzsäure, angesäuert und im Kumagawa-Sutoschen Extraktionsapparat mit Äther extrahiert.

Trotz vorsichtiger Behandlung nach der Vorschrift von E. Salkowski (1882) waren die Versuche vergeblich, als Umwandlungsprodukte Amidhippursäure oder Uramidobenzoesäure zu isolieren. Die verabreichte Amidobenzoesäure wurde in beträchtlicher Menge unverändert im Harne ausgeschieden.

Im ganzen wurden 39,4 g *m*-Amidobenzoesäure verfüttert und die wieder gewonnene betrug 10,5 g. Ihr Schmelzpunkt liegt bei 180°C.

0,1324 g Substanz gaben 11,8 ccm N(15°, 763 mm),

0,1428 g Substanz gaben 0,3204 g CO₂ und 0,0730 g H₂O.

Berechnet für $C_7H_7NO_2$:	Gefunden:
C 61,28%	61,19%
H 5,14%	5,71%
N 10,22%	10,43%.

2. Fütterung von *p*-Amidobenzoessäure.

Die reine *p*-Amidobenzoessäure wurde 1200 Fröschen als Natriumsalz in Dosen von 0,02–0,04 g per Kopf, in Wasser gelöst, subcutan eingegeben. Die Menge des 24 stündigen Harns betrug 12000 ccm. Der Harn wurde nach Angabe von E. Salkowski (1884) auf Uramidobenzoessäure oder Amidohippursäure und nach der Vorschrift von Ellinger und Heusel (1914) auf Acetylverbindung verarbeitet. Wiederum bekam ich aus dem Ätherextrakt nur die unverändert ausgeschiedene *p*-Amidobenzoessäure. Aus heissem Wasser umkrystallisiert, schieden sich schöne Nadeln aus, die bei 192° schmolzen. Durch folgende Analyse ist es zweifellos, dass wir es mit der unverändert ausgeschiedenen *p*-Amidobenzoessäure zu tun haben.

0,1294 g Substanz gaben 12 ccm N (23°, 762 mm),

0,1203 g Substanz gaben 0,2708 g CO₂ und 0,0568 g H₂O.

Berechnet für $C_7H_7NO_2$:	Gefunden:
C 61,28%	61,31%
H 5,14%	5,23%
N 10,22%	10,43%.

3. Fütterung von *o*-Amidobenzoessäure.

o-Amidobenzoessäure wurde in Form von Natriumsalz, in Wasser gelöst, in einer Gesamtquantität von 56,7 g 1721 Fröschen subcutan injiziert und zwar in täglich einmaliger Dosis von 0,02–0,03 g. Die Verarbeitung der Urine geschah in der oben beschriebenen Art. Aus dem Ätherauszug erhielt ich nach mehrmaligem Umkrystallisieren 6,6 g weisse nadelförmige Krystalle, welche gegen 152° schmolzen. Dass es sich um *o*-Amidobenzoessäure handelte, wurde durch folgende Bestimmung bestätigt.

0,1712 g Substanz gaben 15,7 ccm N ((28, 757 mm),
 0,1895 g Substanz gaben 0,4242 g CO₂ und, 0,0895 g H₂O.

Berechnet für C ₇ H ₇ NO ₂ :	Gefunden:
C 61,28%	61,05%
H 5,14%	5,28%
N 10,22%	9,97%

B. ÜBER DAS VERHALTEN DER AMIDOBENZOESÄUREN IM ORGANISMUS DER SCHILDKRÖTE.

Die Angaben über das Vorhandensein von Hippursäure im Reptilienharn stimmen sehr wenig mit einander überein. Im hiesigen Institut wurde das Verhalten des Organismus der Schildkröte gegenüber der einverleibten Benzoessäure untersucht (1926). Dabei wurde sicher festgestellt, dass sich ein äusserst kleiner Anteil verabreichter Benzoessäure mit Glykokoll paart und im Harn ausgeschieden wird.

Meine Fütterungsversuche mit drei isomeren Amidobenzoessäuren an Schildkröten beweisen, dass nach Eingabe von Amidobenzoessäuren weder die entsprechenden Glykokollverbindungen noch andere gepaarte Produkte im Harn auftreten.

1. Fütterung von *m*-Amidobenzoessäure.

125 Schildkröten wurde zuerst die Haut um den Anus mit einem Faden abgebunden, um den Harn ohne Verlust zu erhalten, und dann je 0.4 g *m*-Amidobenzoessäure als Natriumsalz in wässriger Lösung injiziert. Die Menge des 24 stündigen Harns betrug 3640 ccm. Der Harn wurde wie beim Frosharn zuerst zu dünnem Sirup eingedampft, mit heissem Alkohol extrahiert, der Alkoholauszug eingedampft, in Wasser gelöst, mit Essigsäure angesäuert, und wiederholt mit grossen Mengen Äther extrahiert. Die ätherische Lösung wurde hierauf abgedampft, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und mit Tierkohle entfärbt, woraus im ganzen 15,5 g reine *m*-Amidobenzoessäure isoliert wurden. Ihr Schmelzpunkt liegt bei 180°.

0,1642 g Substanz gaben 14,8 ccm N (21°, 761 mm),
0,1277 g Substanz gaben 0,2868 g CO₂ und 0,0618 g H₂O.

Berechnet für C ₇ H ₇ NO ₂ :	Gefunden:
C 61,28%	61,25%
H 5,14%	5,41%
N 10,22%	10,22%

2. Fütterung von *p*-Amidobenzoessäure.

128 Schildkröten wurden je 0,4 g *p*-Amidobenzoessäure als Natriumsalz in wässriger Lösung subcutan injiziert. Der Harn wurde in der oben beschriebenen Weise verarbeitet. Aus Ätherextrakt wurde nur die unverändert ausgeschiedene Säure isoliert. Aus heissem Wasser umkrystallisiert, schieden sich schöne Nadeln aus, die bei 192° schmolzen.

0,1245 g Substanz gaben 11,3 ccm N (17,5, 763 ccm),
0,1348 g Substanz gaben 0,3040 g CO₂ und 0,0646 g H₂O.

Berechnet für C ₇ H ₇ NO ₂ :	Gefunden:
C 61,28%	61,50%
H 5,14%	5,34%
N 10,22%	10,50%.

Sie erwiesen sich als unveränderte *p*-Amidobenzoessäure. Im ganzen wurden 51,2 g verfüttert und die wieder gewonnene Menge betrug 12,4 g.

3. Fütterung von *o*-Amidobenzoessäure.

o-Amidobenzoessäure wurde in Form von Natriumsalz in Wasser gelöst in einer Gesamtmenge von 38,2 g an 126 Schildkröten subcutan eingespritzt und zwar in täglich einmaliger Dosis von 0,2–0,4 g. Die vereinigten alkoholischen Auszüge der frisch eingedampften Urine wurden nach dem Abdestillieren mit Wasser aufgenommen und unter Zusatz von Essigsäure mit grossen Mengen Äther extrahiert. Nach mehrfachen Untersuchungen bekam ich wiederum nur die unverändert ausgeschiedene *o*-Amidobenzoessäure

als weissliche, nadelförmige Krystalle, die gegen 152° schmolzen. Im ganzen erhielt ich nur 1,1 g, also unter 3% der verabreichten Mengen.

0,1286 g Substanz gaben 11,7 cem N (18,760 mm),

0,1425 g Substanz gaben 0,3190 g CO_2 und 0,0678 g H_2O .

Berechnet für $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2$: Gefunden:

C 61,28% 61,05%

H 5,15% 5,32%

N 10,22% 10,46%.

Es unterliegt keinem Zweifel, dass die hier erhaltene Verbindung mit *o*-Amidobenzoessäure identisch war. Unentschieden bleibt dabei, warum sich *o*-Amidobenzoessäure verschieden von beiden Isomeren verhält.

ZUSAMMENFASSUNG.

Bei den Versuchen an Fröschen zeigte sich, dass drei isomere Amidobenzoessäuren nach der Fütterung stets gleichmässig in etwa 20% in dem Harn unverändert ausgeschieden werden. Trotz sorgfältigen Suchens nach Uramidobenzoessäuren und Amidohippursäuren wurden solche doch nicht gefunden.

Ähnlich wie bei Fröschen verhielten sich Meta- und Para-Amidobenzoessäure bei Schildkröten, während die Ortho-Verbindung im Organismus dieses Tiers sehr leicht umgewandelt wurde und nur ein kleiner Teil (weniger als 3%) unverändert in den Harn überging. Demnach ist das physiologische Schicksal der Meta- und Para-amidobenzoessäure im Organismus der Schildkröte ähnlich dem, das Komori mit Sendju und anderen (1926) für die Benzoessäure beobachtet haben, dass sie nämlich mit Glykokoll sich kaum paart und in etwa 20% im Harn ausgeschieden wird.

Die weitere Frage, ob die *o*-Verbindung im Organismus der Schildkröte eine Glukuronsäurepaarung eingeht, steht noch dahin.

LITERATUR.

- Ellinger u. Heusel (1914): H-S, Zs. f. physiol. Chem. **91**, 21.
Graebe u. Schultze (1897): Liebig, Ann. d. Chem. **142**, 345.
Komori, Sendju u. A. (1926): Diese Zs. **6**, 24.
Mitsuba u. Ichihara (1927): H-S, Zs. f. physiol. Chem. **104**, 244.
Salkowski (1882): H-S, Zs. f. physiol. Chem. **7**, 93.

ON THE INFLUENCE OF HYDROGEN-ION CONCENTRATION UPON THE INACTIVATION OF UREASE BY SOME HEAVY METAL SALTS.

By

MATSUNOSUKE KITAGAWA.

*(From the Biochemical Laboratory, Department of Agriculture,
Kyushu Imperial University, Fukuoka.)*

(Received for publication, October 10, 1928.)

In the preceding paper (1928) I have reported the inactivation of jack bean urease by a trace of unknown inhibitors contained in distilled water etc., which was intensified by increasing the pH of the medium.

In the present study I have been concerned with the influence of the pH upon the inactivation of urease by using some heavy metal salts, in order to confirm the former results about unknown inhibitors, and further to make as clear as possible the nature of the urease inactivated by a heavy metal ion.

Experimental part.

I. THE COMPARISON OF ACETATE AND PHOSPHATE AS BUFFER SOLUTIONS FOR THE RESEARCH OF THE INACTIVATION OF UREASE.

In the following experiments, I used an acetate mixture as a buffer solution, because, as shown in the previous paper, the usual phosphate buffer itself has already shown some protective action against urease inactivation.

Compared with phosphate, however, the buffer action of acetate was weak at neutral range, therefore the pH was adjusted by adding drop by drop $n/20$ acetic acid solution and comparing with the standard colour during the reaction.

1. *The protective action of phosphate against unknown inhibitors in distilled water.*

{ Urease (dialysed) 0.11 mg
 { 0.1 g urea in 10 cc. m/10 buffer solution (pH 7.0)
 { 25° 30'

Buffer solution	0.1 g Glycocoll added	Activity (N/50 NH ₃ cc.)	Inactivation %
Phosphate mixture	+	15.3	—
” ”	—	13.1	14
Acetate mixture	—	7.1	53

2. *Zn salt influence in phosphate solution.*

{ Urease 0.11 mg
 { 0.1 g urea in 10 cc. m/10 phosphate solution (pH 7.0)
 { 25° 30'

Substance added	Activity
Glycocoll 0.1 gm.	15.2
—	14.4
Zn 0.02 mg (added as ZnSO ₄)	13.7
” 0.05	14.2
” 0.10	13.9
” 0.20	13.6

3. *Zn salt influence in acetate solution.*

{ Urease 0.11 mg
 { 0.1 g urea in m/10 acetate solution (pH 7.0) (previously treated
 { with fibrin as described in preceding paper)
 { 25° 30'

Substance added	Activity
Glycocoll 0.1 gm.	14.2
—	12.0
— (not treated with fibrin)	8.3
Zn 0.01 mg	10.9
„ 0.02	9.6
„ 0.05	7.5

The inactivation by Zn ion is scarcely observed in the phosphate buffer, but distinctly in the acetate buffer, as well as in the case of the inactivation by unknown inhibitors, and nearly all inhibitors are removed from the reaction system by the previous treatment with fibrin, which was always used in the following experiments for the removal of unknown inhibitors.

Such a distinct inactivation in an acetate buffer is never due to acetate itself, as is shown in the following experiment.

4. *Acetate influence on urease.*

{ Urease 0.11 mg
 { 1% urea 10 c.c. (not previously treated with fibrin)
 { 25° 30' pH 7.0

Acetate conc. in solution	0.1 g Glycocoll added	Activity
$\frac{n}{10}$	+	15.5
0	—	7.4
$\frac{n}{20}$	—	8.2
$\frac{n}{10}$	—	8.0
$\frac{n}{5}$	—	7.7
$\frac{n}{2.5}$	—	6.9

II. pH INFLUENCE UPON THE INACTIVATION BY SOME
HEAVY METAL SALTS.

5. Inactivation by Zn ion.

{ Urease 0.11 mg
 0.1 g urea in 10 cc. n/10 acetate solution
 Zn 0.08 mg (1.2×10^{-4} mol) (added as ZnSO_4)
 25° 30'

pH	Activity		Inactivation %
	+ 0.1 gm. glycocoll(G)	— glycocoll	
7.3	10.9	1.7	84
7.0	12.3	4.8	60
6.0	9.9	9.8	0

{ Urease 0.11 mg
 Zn 0.30 mg (4.5×10^{-4} mol)
 25° 30'

pH	Activity		Inactivation %
	+ G	— G	
7.3	9.2	0.0	100
7.0	10.6	0.8	92
6.0	8.7	7.2	17

6. Inactivation by Cu ion.

{ Urease 0.11 mg
 Cu 0.003 mg (4.7×10^{-6} mol) (added as CuSO_4)
 25° 30'

pH	Activity		Inactivation %
	+ G	— G	
7.3	11.0	0.0	100
7.0	11.5	0.6	94
6.0	9.9	3.8	62

Some amount of CuSO_4 was added to the urease solution to bring about the precipitation which was redissolved by the addition of glycocoll.

7. *Inactivation by Hg ion.*

{ Urease 0.17 mg
Hg 0.0005 mg (2.4×10^{-7} mol) (added as HgCl_2)
25° 30'

pH	Activity		Inactivation %
	+ 16 mg KCN	— KCN	
7.0	15.3	0.5	97
6.0	12.7	0.4	97

At pH 7.0 and 7.3 urease (0.11 mg—0.17 mg) was greatly inactivated, to almost the same extent by 4.5×10^{-4} mol Zn, 4.7×10^{-6} mol Cu or 2.4×10^{-7} mol Hg, while at pH 6.0 the same amount of Zn showed no influence or a very slight influence upon urease, but Cu already inactivated by 62 % of total urease and the inactivation by Hg was scarcely decreased with increasing acidity.

Previously, Kodama (1923) observed that the Zn ion combined with the protein anion (ovalbumin) only on the alkaline side of its isoelectric point (pH 5.7), but the Cu ion combined even on the acidic side (pH 5.1) and the Hg ion farther on the acide side (pH 4.0).

Accordingly as regards the pH influence, a distinct similarity is recognized between the inactivation of urease by a heavy metal ion and the combination of protein with a heavy metal ion.

Regarding the increase of the inactivation of an enzyme by a heavy metal ion in alkaline medium, H. v. Euler & K. Myrbäck (1923) have also made observations in the case of saccharase inactivation by Ag ion.

From these facts I suggest that urease exists on the alkaline side as a more easy combinable form with a heavy metal ion,

or a more anionic form, than on the acidic side, and combines with a metal ion to form an indissociable complex salt, which is no longer reactive with urea and is first decomposed by the addition of glycocoll or other auxosubstances to set urease free.

On the other hand, I attempted the isolation of crystalline urease by Sumner's modified method (1928), but always failed to obtain an active and crystalline urease such as Sumner describes.

Therefore in spite of the above similarity to protein, I can not determine whether or not urease is equal to protein, as described by Sumner, and whether the chemical group combinable with a metal cation in urease molecule is COOH radical just as in protein, or whether some complex group necessary for catalytic action in urease is especially sensitive to metal as suggested by Jacoby (1927).

III. pH INFLUENCE UPON THE INACTIVATION BY HALOGEN SALTS.

In the case of halogen salts, a larger amount was required for the inactivation of urease than in the case of a heavy metal salt.

8. Inactivation by KI.

{ Urease 0.33 mg
0.1 g urea in 10 cc. n/10 acetate
KI 2 g (1.2 mol)
25° 15'

pH	Activity			Inactivation %
	— KI	+ KI		
	+ 0.1 gm. glycocoll (G)	+ G	— G	
7.3	10.5	7.7	7.5	0
6.0	10.2	7.2	1.0	86

{ Urease 0.13 mg
KI 2 g (1.2 mol)
25° 15'

pH	Activity			Inactivation %
	— KI	+ KI		
	+ 0.1 gm. G	+1 g G	— G	
7.3	14.4	7.6	4.5	41
6.0	14.1	4.2	1.0	76

9. *Inactivation by NaCl.*

{ Urease 0.26 mg
 NaCl 1 g (1.7 mol)
 25° 15'

pH	Activity		
	— NaCl	+ NaCl	
	+ 0.1 gm. G	+ G	— G
7.3	20.4	5.0	4.2
6.0	19.7	6.8	6.1

10. *Comparison of inactivations by KCl and KI.*

{ Urease 0.26 mg
 KCl 1 gm.
 KI 2.2 gm } (1.3 mol)

pH	Salt added	1 gm. glycooll (1.3 mol)	Activity
7.0	—	+	8.9
"	KCl	+	4.8
"	"	—	4.7
"	KI	+	4.8
"	"	—	4.7
6.0	—	+	8.3
"	KCl	+	3.9
"	"	—	4.9
"	KI	+	1.1
"	"	—	0

In these cases urease was greatly inactivated even by the addition of glycocoll, which was supposed to be due to a physical change of urease in the high concentration of salt (10-20%).

pH influence on inactivation was scarcely observed in the case of NaCl or KCl, but about KI the influence of pH was recognized and was inverse to those in the case of a heavy metal, that is, the inactivation increased on the acidic side.

But for this reason I can not decide whether this increase is ascribable to the more cathionic existence of the urease molecule on the acidic side, or to the trace of free iodine produced from KI in a slightly acidic medium, despite the fact that no free iodine could be detected by the starch test during the reaction, because even a trace of free iodine is sufficient to inactivate urease, as is shown in the following.

11. Comparison of inactivations by free iodine and ionic iodine.

{ Urease 0.33 mg
{ 25° 15' pH 7.0

Substance added	0.1 gm. glycocoll	Activity
—	+	11.9
KI 1 gm. (0.6 mol)	—	11.0
"	+	10.8
KI 0.2 gm. + free I 0.2 mg (0.0015 mol)	—	0.0
" "	+	0.0

SUMMARY.

The inactivation of urease by a heavy metal ion is intensified with the increasing pH of the medium, that is, a less injurious heavy metal (Zn) is inhibitory only on the alkaline side from about pH 6.0, but a more injurious metal (Cu or Hg) is inhibitory both on the alkaline side and somewhat even on the acidic side.

This fact is very similar to the pH influence upon the combination of protein with a heavy metal observed by Kodama (1923).

As regards the pH influence, the unknown inhibitors spontaneously contained in distilled water etc., reported in the preceding paper, are considered to be due to contamination with a trace of some heavy metal ions.

Free iodine is very injurious to urease compared with KI and the inactivation by KI increases on the acidic side inverse to those by a heavy metal ion.

REFERENCES.

- Euler, H. v. and Myrbäck, K. (1923): Zs. phys. chem. **130**, 87.
Jacoby, M. (1927): Biochem. Zs. **181**, 194.
Kitagawa, M. (1928): Jour. biochem. **9**, 347.
Kodama, K. (1923): Jour. biochem. **2**, 505.
Sumner, J. B. and Hand, D. B. (1928): Jour. biol. chem. **79**, 149.

STUDIEN ÜBER DIE FERMENTATIVE SPALTUNG DER ACETYL-, FORMYL-, UND BENZOYL- DERIVATE DER AMINOSÄUREN.

Von

HIDEO KIMURA.

*(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der kaiserlichen Universität
zu Kioto. Direktor: Prof. Dr. K. Mayeda.)*

(Eingegangen am 18. Oktober, 1928.)

Seit O. Schmiedeberg im Jahre 1881 das Histozym, das die Hippursäure in Benzoessäure und Glykokoll zu spalten vermag, in den Nieren des Schweins und der Leber des Hundes entdeckt hatte, wurde dieses Enzym in verschiedenen Organen verschiedener Säugetiere aufgefunden.

Das Histozym spaltet nicht nur die Hippursäure, sondern auch die Benzoylderivate anderer Aminosäuren (Mutch, 1912; Tamura, 1924). Nach Bondi und seinen Mitarbeitern (1909, 1910) werden die sogenannten Lipopeptide wie Butyrylglycin, Butyrylalanin, Laurylglycin, Laurylalanin u.s.w. durch die autolysierende Niere und Leber gespaltet. Nach diesen Ergebnissen ist es noch nicht sichergestellt, ob die Spaltung der Lipopeptide durch das Histozym selbst, oder ein vom Histozym ganz anderes Gewebsferment hervorgerufen wird.

Um diese Frage aufzuklären, stellte ich die Acetyl- und Formylderivate von Glykokoll, dl-Leucin und dl-Phenylalanin dar, liess darauf die Glycerinauszüge verschiedener Organe vom Kaninchen, Schwein und Hund einwirken und bestätigte, dass, wie aus den unten gegebenen Tabellen ersichtlich ist, die Acetyl-derivate der Aminosäuren durch die gebrauchten Organauszüge nicht gleich stark hydrolysiert werden und ferner die Spaltung der Acetyl- und Formylderivate der Aminosäuren mit der Spaltung der Hippursäure nicht parallel verläuft.

Experimenteller Teil.

I. DARSTELLUNG DER ACETYL- UND FORMYLDERIVATE VON GLYCIN, dl-LEUCIN UND dl-PHENYLALANIN.

Acetyl-glycin:

Acetyl-glycin wurde nach T. Curtius und Radenhausen durch Erwärmen von Glykokoll mit etwas mehr als der berechneten Menge reinen Essigsäureanhydrids dargestellt.

Acetyl-dl-Leucin:

5 g dl-Leucin wurden mit dem gleichen Volumen Essigäther auf dem Wasserbade erhitzt. Dann wurde die heisse Mischung mit der $1\frac{1}{2}$ fachen Menge reinen Essigsäureanhydrids versetzt. Nach einiger Zeit wurde unverändertes dl-Leucin durch Alkoholzusatz gefällt und abfiltriert. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade unter Ersatz von Alkohol bis zum Verschwinden des Essigsäuregeruchs abgedampft. Der krystallinische Rückstand wurde aus heissem Wasser umkrystallisiert. Ausbeute: 4,5 g. Schmelzpunkt 161°C .

Acetyl-dl-Phenylalanin:

5 g nach Erlenmeyer jun. durch Synthese aus Hippursäure und Benzaldehyd hergestelltes reines dl-Phenylalanin wurden so leicht wie bei Acetyl-dl-Leucin acetyliert. Das aus heissem Wasser umkrystallisierte Produkt stellte rhombische Tafeln dar und schmolz bei 144°C (unkor.). Ausbeute 4 g.

0,1602 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 7,75 ccm n/10 Schwefelsäure.

Berechnet für $\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)\cdot\text{COOH}$ 6,76%N.

Gefunden 6,79%N.

Formyl-glycin, Formyl-dl-Leucin und Formyl-dl-Phenylalanin wurden nach E. Fischer durch Formylierung von Glycin, dl-Leucin und dl-Phenylalanin dargestellt.

II. WIRKUNG DER GLYCERINAUSZÜGE DER KANINCHENORGANE AUF
DIE ACETYL- UND FORMYLDERIVATE VON GLYCIN, dl-LEUCIN
UND dl-PHENYLALANIN UNTER BESONDERER BERÜCK-
SICHTIGUNG DER SPALTUNG DER HIPPURSÄURE.

Der Organglycerinauszug wurde auf folgende Weise hergestellt: Nach Abtöten durch Verblutung wurden die Organe möglichst bald aus dem Körper entfernt. Jedes Organ wurde mit Sand und dann mit der 3 fachen Gewichtsmenge Glycerin gut verrieben und im Eisschrank aufbewahrt. Beim Gebrauch wurde die obere schwach getrübe Schicht abpipettiert.

1) *Versuch mit Acetyl-, Formyl- und Benzoylglycin (Hippursäure).*

0,125 g Acylaminosäuren wurden durch Zusatz einer berechneten Menge von n-Natronlauge in Natriumsalz übergeführt, mit 5 ccm m/15 Phosphatmischung (pH 7,0–7,2) und 2 ccm Organglycerinauszug versetzt, mit Wasser auf 25 ccm gebracht und unter Toluolzusatz bei 37°C digeriert.

Zur Kontrolle wurde das Gemisch, welches 2 ccm Glycerinauszug und 5 ccm m/15 Phosphatmischung in 25 ccm Wasser enthielt, mit etwas Toluol versetzt und bei 37°C digeriert.

Der abgespaltene Aminostickstoff bei der Digerierung wurde durch Formoltitration nach Sörensen bestimmt. Die dabei erhaltenen Resultate sind in Tabellen I, II und III angegeben.

2) *Versuch mit Acetyl- und Formyl-dl-Leucin und Acetyl- und Formyl-dl-Phenylalanin.*

Bei diesem Versuch wurde in ganz derselben Weise wie beim vorigen gearbeitet.

0,125 g Acetyl- und Formylderivate von dl-Leucin und dl-Phenylalanin wurden in berechneter n-Natronlauge gelöst, mit 5 ccm m/15 Phosphatmischung (pH 7,2) und 2 ccm Organextrakt versetzt und mit Wasser auf 25 ccm gebracht. Das Digestionsgemisch wurde unter Toluolzusatz bei 37°C digeriert.

Die Tabelle IV gibt nur die wahre Zunahme des Alkali-

TABELLE I.

a) Acetylglycin.

0,125 g Acetylglycin + 2 ccm Organextrakt + 5 ccm m/15 Phosphatmischung + 18 ccm Wasser. Das Gemisch wurde unter Toluolzusatz bei 37°C digeriert und 5 ccm desselben von Zeit zu Zeit für die Bestimmung entnommen.

Organe	Stunden	Kontroll- versuch	Verdaunungs- flüssigkeit	Zunahme	Abgespal- tener N in %.
		Alkaliver- brauch in 5 ccm (n/10 Alkali in ccm)	Alkaliver- brauch in 5 ccm (n/10 Alkali in ccm)		
Niere	0	1,20	1,20	0	100,0 104,5
	20	1,20	3,40	2,20	
	68	1,20	3,50	2,30	
	140	1,20	3,50	2,30	
Leber	0	1,20	1,30	0,10	70,5 104,5
	20	1,20	2,75	1,15	
	68	1,20	3,50	2,30	
	140	1,20	3,50	2,30	
Pankreas	0	1,00	1,00	0	18,2
	20	1,00	1,00	0	
	68	1,00	1,05	0,05	
	140	1,00	1,40	0,40	
Darm	0	1,20	1,20	0	56,8
	20	1,60	1,85	0,25	
	68	1,70	2,40	0,70	
	140	1,70	2,95	1,25	
Muskel (Musculus psoas)	0	1,00	1,00	0	6,8
	20	1,10	1,20	0,10	
	68	1,10	1,20	0,10	
	140	1,10	1,25	0,15	
Herz	0	1,00	1,00	0	15,9
	20	1,00	1,10	0,10	
	68	1,00	1,10	0,10	
	140	1,00	1,35	0,35	
Lunge	0	1,10	1,10	0	34,10
	20	1,10	1,20	0,10	
	68	1,10	1,50	0,40	
	140	1,10	1,85	0,75	
Hoden	0	1,00	1,00	0	31,8
	20	1,00	1,10	0,10	
	68	1,00	1,20	0,20	
	140	1,10	1,80	0,70	

TABELLE II.

b) Formylglycin.

0,125 g Formylglycin + 2 ccm Organextrakt + 5 ccm m/15 Phosphatmischung + 18 ccm Wasser. Das Gemisch wurde unter Toluolzusatz bei 37°C digeriert und 5 ccm desselben von Zeit zu Zeit für die Bestimmung entnommen.

Organe	Stunden	Kontroll- versuch	Verdaunungs- flüssigkeit	Zunahme	Abgespal- tener N in %.
		Alkaliver- brauch in 5 ccm (n/10 Alkali in ccm)	Alkaliver- brauch in 5 ccm (n/10 Alkali in ccm)		
Niere	0	1,20	1,25	0,05	81,2 108,3
	20	1,20	3,15	1,95	
	68	1,20	3,80	2,60	
	140	1,20	3,80	2,60	
Leber	0	1,20	1,25	0,05	33,8 87,5 106,3
	20	1,20	2,00	0,80	
	68	1,20	3,30	2,10	
	140	1,20	3,75	2,55	
Pankreas	0	1,00	1,05	0,05	10,4
	20	1,00	1,03	0,03	
	68	1,00	1,05	0,05	
	140	1,00	1,25	0,25	
Darm	0	1,20	1,25	0,05	14,6
	20	1,60	1,75	0,15	
	68	1,70	2,00	0,30	
	140	1,70	2,05	0,35	
Muskel (Musculus psoas)	0	1,00	1,00	0	10,4
	20	1,10	1,20	0,10	
	68	1,10	1,18	0,08	
	140	1,10	1,35	0,25	
Herz	0	1,00	1,05	0,05	12,5
	20	1,00	1,15	0,15	
	68	1,00	1,20	0,20	
	140	1,00	1,30	0,30	
Lunge	0	1,10	1,10	0	18,8
	20	1,10	1,20	0,10	
	68	1,10	1,30	0,20	
	140	1,10	1,55	0,45	
Hoden	0	1,00	1,00	0	14,6
	20	1,00	1,20	0,20	
	68	1,00	1,20	0,20	
	140	1,10	1,45	0,35	

TABELLE III.

e) Benzoylglycin.

0,125 g Benzoylglycin + 2 cem Organextrakt + 5 cem m/15 Phosphatmischung + 18 cem Wasscr. Das Gemisch wurde unter Toluolzusatz bei 37°C digeriert und 5 cem desselben von Zeit zu Zeit für die Bestimmung entnommen.

Organe	Stunden	Kontroll- versuch	Verdauungs- flüssigkeit	Zunahme	Abgespal- tener N in %.
		Alkaliver- brauch in 5 cem (n/10 Alkali in cem)	Alkaliver- brauch in 5 cem (n/10 Alkali in cem)		
Niere	0	1,20	1,20	0	21.4
	20	1,20	1,20	0	
	68	1,20	1,40	0,20	
	140	1,20	1,50	0,30	
Leber	0	1,20	1,20	0	0
	20	1,20	1,20	0	
	68	1,20	1,30	0,10	
	140	1,20	1,20	0	
Pankreas	0	1,00	1,00	0	0
	20	1,00	1,00	0	
	68	1,00	1,00	0	
	140	1,00	1,00	0	
Darm	0	1,20	1,25	0,05	0
	20	1,60	1,60	0	
	68	1,70	1,70	0	
	140	1,70	1,70	0	
Muskel (Musculus psoas)	0	1,00	1,00	0	0
	20	1,10	1,10	0	
	68	1,10	1,10	0	
	140	1,10	1,10	0	
Herz	0	1,00	1,00	0	0
	20	1,00	1,00	0	
	68	1,00	1,00	0	
	140	1,00	1,00	0	
Lunge	0	1,10	1,10	0	0
	20	1,10	1,10	0	
	68	1,10	1,10	0	
	140	1,10	1,10	0	
Hoden	0	1,00	1,00	0	0
	20	1,00	1,00	0	
	68	1,00	1,00	0	
	140	1,10	1,10	0	

TABELLE IV.

Organe	Std.	Zunahme d. Alkaliverbrauchs in 5 cem Verdauungsflüssigkeit an n/10 Alkali in cem				Abgespalteter N in %.			
		Acetyl- dl-Leucin	Formyl- dl-Leucin	Acetyl- dl-Phenylalanin	Formyl- dl-Phenylalanin	Acetyl- dl-Leucin	Formyl- dl-Leucin	Acetyl- dl-Phenylalanin	Formyl- dl-Phenylalanin
Niere	0	0	0	0	0,05				
	20	0,85	0,90	0,70	0,70				
	68	0,80	0,85	0,70	0,70	55,1	53,1	56,0	51,9
Leber	0	0	0	0	0				
	20	0,85	0,75	0,20	0,10				
	68	0,80	0,75			55,1			
	140			0,40	0,20		46,8	32,0	14,8
	212			0,40	0,20				
Pankreas	0	0	0	0	0				
	20	0,05	0,05	0	0				
	140	0,20	0,10	0	0				
	212	0,30	0,20	0	0	20,7	12,5	0	0
Darm	0	0	0	0	0				
	20	0,15	0,20	0,05	0				
	140	0,75	0,60	0	0	51,7			
	212		0,70	0	0		43,8	0	0
Muskel (Musculus psoas)	0	0	0	0	0				
	20	0,05	0,05	0,10	0				
	140	0,40	0,20	0	0				
	212	0,55	0,35	0	0	37,9	21,9	0	0
Herz	0	0	0	0	0				
	20	0,15	0,05	0	0				
	140	0,70	0,60	0	0				
	212		0,70	0	0	48,3	43,8	0	0
Lunge	0	0	0	0	0				
	20	0,05	0	0	0				
	140	0,70	0,40	0	0				
	212	0,70	0,42	0	0	48,3	26,3	0	0
Hoden	0	0	0	0	0				
	20	0,10	0,05	0	0				
	140	0,55	0,35	0	0				
	212	0,65	0,50	0	0	44,8	31,3	0	0

verbrauchs bei der Digerierung, welche man durch Abziehen der verbrauchten Alkanimenge in der Kontrolllösung von der in der Digestionsmischung erhält.

Aus diesen Tabellen I–IV geht hervor, dass Niere und Leber des Kaninchens die Hippursäure ganz spärlich oder überhaupt nicht spalten, Acetyl- und Formylderivate dagegen äusserst schnell anzugreifen vermögen und zwar bei dl-Leucin und dl-Phenylalanin im asymmetrischen Sinne. Die Acetyl- und Formylderivate von dl-Leucin wurden nicht nur durch Niere und Leber, sondern auch durch andere verschiedene Organe leicht gespalten.

III. WIRKUNG DES ORGANGLYCERINAUSZUGES DES SCHWEINS AUF ACETYL- UND FORMYLDERIVATE VON GLYCIN, dl-LEUCIN UND dl-PHENYLALANIN UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER SPALTUNG DER HIPPURSÄURE.

Dieser Versuch wurde in der oben beschriebenen Weise ausgeführt.

1) *Versuch mit Acetyl-, Formyl- und Benzoylglycin (Hippursäure).*

Je 0,125 g Acetyl-, Formyl- und Benzoylglycin wurden in der berechneten Menge n-Natronlauge gelöst, mit 5 ccm m/15 Phosphatmischung (pH 7,2) und 2 ccm Organextrakt versetzt und mit Wasser genau auf 25 ccm verdünnt. Das Digestionsgemisch wurde unter Zusatz von etwas Toluol bei 37°C digeriert.

Die dabei erhaltenen Resultate finden sich in Tabelle V zusammengestellt.

2) *Versuch mit Acetyl- und Formylderivaten von dl-Leucin und dl-Phenylalanin.*

Je 0,125 g Acetyl- und Formylderivate von dl-Leucin und dl-Phenylalanin wurden in der berechneten Menge n-Natronlauge gelöst, mit 5 ccm m/15 Phosphatmischung (pH 7,2) und 2 ccm Organextrakt versetzt und mit Wasser genau auf 25 ccm verdünnt.

Das Digestionsgemisch wurde unter Zusatz von etwas Toluol bei 37°C digeriert.

TABELLE V.

Organe	Std.	Zunahme d. Alkaliverbrauchs in 5 cem Verdauungsflüssigkeit an n/10 Alkali in cem			Formoltitrierbarer N in %.		
		Acetyl-glycin	Formyl-glycin	Benzoyl-glycin	Acetyl-glycin	Formyl-glycin	Benzoyl-glycin
Niere	0	0	0,05	0			
	20	2,20	2,40	0,55	100,0	100,0	
	68			1,40			100,0
Leber	0	0,05	0,10	0			
	20	2,20	1,10	0,10	100,0		
	68		2,40	0,70		100,0	
	140			1,40			100,0
Pankreas	0	0	0,05	0			
	20	1,00	0,15	0			
	68	2,00	0,70	0			
	140	2,20	1,15	0	100,0		
	188		1,75	0,20		72,92	14,3
Darm	0	0	0,05	0,05			
	20	0,40	0,10	0			
	68	1,30	0,35	0			
	140	1,90	0,55	0			
	188	2,20	0,85	0	100,0	35,4	0
Muskel	0	0	0	0			
	20	0,50	0,15	0			
	68	1,35	0,30	0			
	140	1,80	0,35	0			
	188	2,05	0,45	0	93,2	18,8	0
Herz	0	0	0	0			
	20	0,85	0,30	0,05			
	68	1,95	0,60	0			
	140	2,30	0,85	0	104,5		
	188		1,25	0,05		52,1	3,6
Lunge	0	0	0,05	0,05			
	20	0,30	0,05	0			
	68	0,90	0,20	0			
	140	1,65	0,40	0			
	188	1,60	0,50	0	72,7	20,8	0
Hoden	0	0	0	0			
	20	0,30	0,15	0			
	68	0,95	0,30	0			
	140	1,55	0,30	0			
	188	1,65	0,35	0	75,0	14,6	0

TABELLE VI.

Organe	Std.	Zunahme d. Alkaliverbrauchs in 5 ccm Verdauungsflüssigkeit an n/10 Alkali in ccm				Abgespaltener N in %.			
		Acetyl- dl-Leucin	Formyl- dl-Leucin	Acetyl- dl-Phenylalanin	Formyl- dl-Phenylalanin	Acetyl- dl-Leucin	Formyl- dl-Leucin	Acetyl- dl-Phenylalanin	Formyl- dl-Phenylalanin
Niere	0	0	0	0	0				
	20	0,75	0,85	0,60	0,05				
	68	0,70	0,80			48,3	50,0	48,0	
	92			0,60	0,50				37,0
	164				0,50				
Leber	0	0	0	0	0				
	20	0,75	0,80	0,35	0				
	68	0,75	0,80			51,7	50,0		
	92			0,60	0,15			48,0	
	164				0,25				18,5
	212				0,25				
Pankreas	0	0	0	0	0				
	20	0,70	0,20	0	0,40				
	92	0,70	0,75	0,40	0,70	48,3	46,8		51,9
	164		0,75	0,65	0,60			52,0	
Darm	0	0	0,05	0	0				
	20	0,60	0,10	0	0				
	92	0,75	0,50	0,05	0	51,7			
	164		0,65	0,15	0,05				3,7
	212		0,70	0,20	0,05		43,8	16,0	
Muskel	0	0	0	0	0				
	20	0,60	0	0	0				
	68	0,75	0,20	0	0	51,7			
	140		0,30	0,05	0				
	188		0,40	0,05	0		25,0	4,0	0
Herz	0	0	0	0	0				
	20	0,75	0,20	0	0				
	68	0,75	0,45	0,10	0	51,7			
	140		0,70	0,20	0		43,8	16,0	
	188		0,70	0,20	0				0
Lunge	0	0	0	0	0				
	20	0,50	0,05	0	0				
	140	0,75	0,45	0,05	0	51,7			
	212		0,50	0,10	0		31,3	8,0	0
Hoden	0	0	0	0	0				
	20	0,40	0,05	0	0				
	68	0,75	0,20	0	0				
	140	0,75	0,35	0,05	0	51,7			
	188		0,40	0,10	0,05		25,0	8,0	3,7

Die Resultate sind in Tabelle VI zusammengestellt.

Wir sehen aus den Tabellen V und VI, dass alle Organe des Schweins Acetyl- und Formylderivate spalten und Hippursäure auch in der Niere und Leber vollständig angegriffen wird.

Bemerkenswert ist, dass Acetyl- und Formyl-dl-Phenylalanin durch Pankreas viel besser als durch Niere oder Leber abgespalten wird, während Hippursäure durch Pankreas fast unzersetzt bleibt.

Die Acylderivate der racemischen Aminosäuren wurden wie bei den mit Kaninchenorganen ausgeführten Versuchen im asymmetrischen Sinne gespalten, indem der Ätherauszug der digerierten Flüssigkeit, in den die nicht zersetzte Acylaminosäure übergeht, die Drehung der Acylderivate der in der Natur nicht vorkommenden Aminosäurekomponente zeigte.

IV-a. WIRKUNG DES ORGANGLYCERINAUSZUGES DES HUNDES AUF ACETYL- UND FORMYLDERIVATE VON GLYCIN, dl-LEUCIN UND dl-PHENYLALANIN UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER SPALTUNG DER HIPPURSÄURE.

Dieser Versuch wurde in derselben Weise wie bei Kaninchen ausgeführt.

1) *Versuch mit Acetyl-, Formyl- und Benzoylglycin (Hippursäure).*

Je 0,125 g Acetyl-, Formyl- und Benzoylglycin wurden in der berechneten Menge n-Natronlauge gelöst, mit 5 ccm m/15 Phosphatmischung (pH 7,2) und 2 ccm Organextrakt versetzt und mit Wasser auf 25 ccm verdünnt. Das Gemisch wurde unter Zusatz von etwas Toluol bei 37°C digeriert.

TABELLE VII.

Organe	Std.	Zunahme d. Alkaliverbrauchs in 5 cem Verdauungsflüssigkeit an n/10 Alkali in cem			Abgespaltener N in %.		
		Acetyl- glycin	Formyl- glycin	Benzoyl- glycin	Acetyl- glycin	Formyl- glycin	Benzoyl- glycin
Niere	0	0	0	0			
	22	2,30	2,25	0,25			
	68	2,30	2,50	0,35	104,5	104,2	
	140			0,40			28,6
	188			0,40			
Leber	0	0	0	0			
	22	0,05	0,05	0,05			
	68	0,10	0,10	0			
	140	0,10	0,15	0,05			
	188	0,15	0,15	0,05	6,82	6,3	3,6
Pankreas	0	0	0	0			
	22	0,10	0	—			
	68	0,25	0,15	0			
	140	0,25	0,15	0			
	188	0,30	0,15	0	13,6	6,3	0
Darm	0	0	0	0			
	22	0	0,05	0			
	68	0,15	0,15	0			
	140	0,35	0,25	0			
	188	0,45	0,20	0	20,5	8,3	0
Muskel (Musculus psoas)	0	0	0	0			
	22	0	0	0			
	68	0	0,10	0			
	140	0,15	0,15	0			
	188	0,20	0,20	0	9,09	8,3	0
Herz	0	0	0,05	0			
	22	0	0	0			
	68	0	0	0			
	140	0	0,05	0			
	188	0	0	0	0	0	0
Lunge	0	0	0	0			
	22	0	0,05	0			
	68	0,05	0,05	0			
	140	0,10	0,20	0			
	188	0,15	0,15	0	6,8	6,3	0
Milz	0	0	0,05	0			
	22	0,05	0,05	0			
	68	0,10	0,15	0			
	140	0,10	0,20	0			
	188	0,10	0,15	0	4,6	6,2	0

2) Versuch mit Acetyl- und Formylderivaten von dl-Leucin und dl-Phenylalanin.

0,125 g Acetyl- und Formylderivate von dl-Leucin und dl-Phenylalanin wurden in der berechneten Menge n-Natronlauge gelöst, mit 5 ccm m/15 Phosphatmischung (pH 7,2) und 2 ccm Organextrakt versetzt und mit Wasser genau auf 25 ccm verdünnt. Das Digestionsgemisch wurde unter Zusatz von etwas Toluol bei 37°C digeriert.

Die Resultate sind in Tabelle VIII zusammengestellt.

TABELLE VIII.

Organe	Std.	Zunahme d. Alkaliverbrauchs in 5 ccm Verdauungsflüssigkeit an n/10 Alkali in ccm				Formoltitrierbarer N in %.			
		Acetyl- dl-Leucin	Formyl- dl-Leucin	Acetyl- dl-Phenylalanin	Formyl- dl-Phenylalanin	Acetyl- dl-Leucin	Formyl- dl-Leucin	Acetyl- dl-Phenylalanin	Formyl- dl-Phenylalanin
Niere	0	0	0	0	0				
	20	0,75	0,85	0,50	0				
	68	0,75	0,85	0,70	0,15	51,7	53,1		
	140			0,75	0,35			60,0	
	188				0,45				33,0
Leber	0	0	0	0	0				
	20	0,05	0,05	0	0				
	68	0,25	0,10	0	0				
	140	0,55	0,20	0	0		12,5		
	188	0,55	0,20	0	0,05	37,9		0	0
Pankreas	0	0	0	0	0				
	20	0,45	0,15	0	0,25				
	68	0,60	0,30	0,05	0,60				
	140	0,70	0,50	0,20	0,60				
	188	0,75	0,45	0,15	0,55	51,7	28,1	12,0	40,7

In allen oben geschilderten Versuchen wurde die Substanz in 0,5%-iger Lösung benutzt. Da beim Vergleichen der enzymatischen Spaltung der Verbindungen die molare Lösung recht rationell sein soll, gebrauchten wir in den darauffolgenden Untersuchungen 1/160 molare Lösung der Substanz im Natriumsalze.

TABELLE IX.

Organe	Std.	Zunahme d. Alkaliverbrauchs in 5 cem Verdauungsflüssigkeit an n/10 Alkali in cem				Formoltitrierbarer N in %.			
		Acetyl-glycin	Formyl-glycin	Benzoyl-glycin	Benzoyl-di-Phenyl-alanin	Acetyl-glycin	Formyl-glycin	Benzoyl-glycin	Benzoyl-di-Phenyl-alanin
Niere	0	0	0	0	0				
	20	1,32	1,12	0,27	0,17				
	68	1,32	1,30	0,55	0,35	105,6	104,0		
	162	—	1,30	0,75	0,55				44,0
	264	—	—	0,80	0,50			64,0	
Leber	0	0	0	0	0				
	20	0	0,02	0					
	68	0	0,05	0					
	192	0,10	0,03	0,05					
	264	0,15	0,10	0,15	0	12,0	8,0	12,0	0
Pankreas	0	0	0	0	0				
	20	0,15	0,05	0	0				
	68	0,60	0,15			88,0			
	192	1,10	0,30	0	0				
	288	1,10	0,25	0	0,10		20,0	0	8,0
Darm	0	0	0	0	0				
	20	0,03	0,08	0	0				
	68	0,10	0,05	0	0				
	192	0,35	0,10	0					
	288	0,55	0,15	0,10	0,10	44,0	12,0	8,0	8,0
Muskel	0	0	0	0	0				
	20	0	0,05	0	0				
	68	0,05	0,05	0,05	0,05				
	192	0,15	0,15	0,05	0,03				
	288	0,20	0,20	0,10	0,10	16,0	16,0	8,0	8,0
Herz	0	0	0	0	0				
	20	0	0	0,05	0				
	68	0	0	0	0				
	192	0	0,03	0	0				
	288	0,05	0	0,05	0,05	4,0	0	4,0	4,0
Lunge	0	0	0	0	0				
	20	0	0	0	0				
	68	0	0,10	0	0				
	192	0,10	0,10	0	0				
	288	0,15	0,05	0,05	0,05	12,0	4,0	4,0	4,0
Milz	0	0	0	0	0				
	20	0	0	0	0				
	68	0	0,03		0				
	192	0,10	0,05		0				
	288	0,15	0,06	0	0	12,0	4,0	0	0
Hoden	0	0	0	0	0				
	20	0	0	0	0				
	68	0	0	0,02	0				
	192	0,10	0,05	0,02					
	288	0,15	0,10	0,05	0,10	12,0	8,0	4,0	8,0

TABELLE X.

Organe	Std.	Zunahme d. Alkaliverbrauchs in 5 cem Verdauungsflüssigkeit an n/10 Alkali in cem				Formtitrierbarer N in %.			
		Acetyl- dl-Leucin	Formyl- dl-Phenylalanin	Acetyl- dl-Leucin	Formyl- dl-Phenylalanin	Acetyl- dl-Leucin	Formyl- dl-Phenylalanin	Acetyl- dl-Leucin	Formyl- dl-Phenylalanin
Niere	0	0	0	0	0				
	20	0,55	0,65	0,52	0,02				
	68	0,55	0,65	0,65	0,15				
	192	0,58	—	0,65	0,35	46,0	52,0	52,0	23,0
	288	—	—	—	0,30				
Leber	0	0	0	0	0				
	20	0,02	0,02	0	0				
	68	0,18	0,05	0	0				
	192	0,40	0,10	0	0				
	288	0,50	0,15	0	0,05	40,0	12,0	0	4,0
Pankreas	0	0	0	0	0				
	20	0,55	0,35	0,15	0,45				
	68	0,55	0,50	0,30	0,60				
	192	0,55	0,60	0,55	0,65				51,0
	288	0,60	0,65	0,65		48,0	51,0	51,0	
Darm	0	0	0	0	0				
	20	0,18	0,08	0	0				
	68	0,55	0,20	0,05	0,05				
	192	0,60	0,33	0,05	0,15				
	288	0,55	0,45	0,15	0,30	44,0	36,0	12,0	24,0
Muskel	0	0	0	0	0				
	20	0,10	0,07	0,03	0				
	68	0,35	0,15	0	0				
	192	0,60	0,25	0	0	48,0	28,0	4,0	0
	288	0,60	0,35	0,05	0				
Herz	0	0	0	0	0				
	20	0	0	0	0				
	68	0,07	0,05	0	0				
	192	0,20	0,10	0	0				
	288	0,30	0,10	0	0	24,0	8,0	0	0
Lunge	0	0	0	0	0				
	20	0,08	0	0	0				
	68	0,20	0,10	0	0				
	192	0,50	0,20	0	0				
	288	0,55	0,25	0	0	44,0	20,0	0	0
Milz	0	0	0	0	0				
	20	0,08	0	0	0				
	68	0,35	0,10	0	0				
	192	0,50	0,20	0	0				
	288	0,55	0,25	0	0	44,0	20,0	0	0
Hoden	0	0	0	0	0				
	20	0	0	0	0				
	68	0,10	0,02	0	0				
	192	0,30	0,10	0	0				
	288	0,40	0,10	0	0,05	32,0	8,0	0	4,0

IV-b. WIRKUNG DES ORGANGLYCERINAUSZUGES DES HUNDES AUF
ACETYL- UND FORMYLDERIVATE VON GLYCIN, dl-LEUCIN UND
dl-PHENYLALANIN UNTER BESONDERER BERÜCKSICH-
TIGUNG DER SPALTUNG DER HIPPURSÄURE UND
DES BENZOYL-dl-PHENYLALANINS.

1) *Versuch mit Acetyl-, Formyl-, Benzoylglycin und Benzoyl-dl-Phenylalanin.*

0,0725 g Acetyl-, 0,0645 g Formyl-, 0,112 g Benzoylglycin und 0,168 g Benzoyl-dl-Phenylalanin wurden in berechneten Mengen n-Natronlauge gelöst, mit 5 ccm Phosphatmischung (pH 7,2) und 2 ccm Organextrakt versetzt und mit Wasser auf 25 ccm verdünnt. Das Digestionsgemisch wurde unter Toluolzusatz bei 37°C digeriert.

Die Resultate sind in Tabelle IX zusammengestellt.

2) *Versuch mit Acetyl- und Formylderivate von dl-Leucin und dl-Phenylalanin.*

0,1083 g Acetyl-, 0,0995 g Formyl-dl-Leucin, 0,1295 g Acetyl- und 0,121 g Formyl-dl-Phenylalanin wurden in der berechneten Menge n-Natronlauge gelöst, mit 5 ccm Phosphatmischung (pH 7,2) und 2 ccm Organextrakt versetzt und mit Wasser auf 25 ccm verdünnt. Das Digestionsgemisch wurde unter Zusatz von etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

Die Resultate sind in Tabelle X zusammengestellt.

Wie aus den angegebenen Tabellen VII–X zu ersehen, wurden Acetyl- und Formylderivate durch die meisten Organe des Hundes gut gespalten, während Hippursäure nur durch die Niere hydrolysiert wird.

Die Spaltung von Benzoyl-dl-Phenylalanin kann man nur bei der Hundsniere beobachten. Die Schweinsniere, die viel schneller als Hundsniere Hippursäure spaltet, zeigt keine Spaltung des Benzoyl-dl-Phenylalanins.

Bei der Hundsleber tritt die Spaltung der Acylaminosäuren im Vergleich mit Schweins- und Kaninchenleber stark zurück, doch spaltet Acetyl-dl-Leucin gut.

Die Spaltung der racemischen Aminosäuren verläuft auch im asymmetrischen Sinne. Die in der Natur nicht vorkommenden optischen Antipoden wurden aus digerierter Flüssigkeit als unzersetzte Acylaminosäuren ausgeäthert und polarimetrisch nachgewiesen.

LITERATUR.

- Bondi, S. u. Eissler, F. (1910): *Biochem. Z.*, **23**, 511.
Bondi, S. u. Franki, Th. (1909): *Biochem. Z.*, **17**, 555.
Curtius, T. u. Radenhausen, R. (1895): *Journ. f. prakt. Chem.*, **52**, 433.
Erlenmeyerjun, E. (1893): *Annal d. Chem. u. Pharm.*, **275**, 1.
Fischer, E. u. Warburg, O. (1905): *Berichte. Deutsch. Chem. Gesellsch.*, **38**, 3997.
Mutch, N. (1912): *Journ. of Physiol.*, **44**, 176.
Schmiedeberg, O. (1881): *Archiv. f. experim. Pathol. u. Pharm.*, **14**, 379.
Smorodinzew, I. A. (1923): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **124**, 123.
Tamura, S. (1924): *Acta schol. med. univer. imper. Kioto*, **6**, 467.

WEITERE STUDIEN ÜBER DIE FERMENTATIVE SPALTUNG DER ACETYL-, FORMYL- UND BENZOYLDERIVATE DER AMINOSÄUREN.

Von

HIDEO KIMURA.

*(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der kaiserlichen Universität
zu Kioto. Direktor: Prof. Dr. K. Mayeda.)*

(Eingegangen am 18. Oktober 1928.)

In der vorigen Abhandlung habe ich mitgeteilt, dass verschiedene Organe wie Niere, Leber, Pankreas, Darmschleimhaut von Kaninchen, Schwein und Hund auf verschiedene Acylaminosäuren spaltende Wirkung aufweisen. Die Acyllderivate der Aminosäuren werden aber durch die gebrauchten Organauszüge nicht gleich stark hydrolysiert und ferner die Spaltung der Acetyl- und Formyllderivate der Aminosäuren verläuft nicht parallel mit der Spaltung der Hippursäure, und zwar spaltet der Pankreasglycerinauszug des Schweins gar nicht die Hippursäure, wohl aber die Acetyl- und Formyllderivate der Aminosäuren, während der Leberglycerinauszug des Schweins auf Formyl-dl-Phenylalanin nur unbedeutend hydrolysierend wirkt, Hippursäure und die sonstigen Acylaminosäuren dagegen rasch und stark spaltet.

Aus diesen Ergebnissen geht wahrscheinlich hervor, dass die untersuchten Acyllderivate der Aminosäuren nicht durch das einzige Ferment Histozyim gespalten werden.

Um festzustellen, ob die Acetyl- und Formyllderivate der Aminosäuren spaltenden Fermente mit Histozyim identisch seien, untersuchte ich die Eigenschaften der Fermente genauer und erhielt die folgenden Resultate.

1. Die optimale Wasserstoffionenkonzentration der Fermente

(sowohl der Acetyl- und Formylderivate der Aminosäuren als auch der Hippursäure spaltenden) liegt zwischen pH 6,4 und pH 7,2.

2. Sowohl Acetyl- als auch Benzoylglycin spaltende Fermente sind bei 20 stündigen Stehen im Eisschrank gegen Säuren und Alkalien ziemlich widerstandsfähig, indem man die Fermente bei pH 1, 2, und 12 in den meisten Fällen vernichtet findet.

3. Die Wirkung der Organauszüge auf Acetyl- und Formylglycin wird durch einstündiges Erhitzen bei 65° und 70°C. deutlich herabgesetzt und bei 75°C. nicht mehr bemerkt.

4. Die Spaltung der Acetylderivate der Aminosäuren und der Hippursäure wird durch Zusatz von Natriumacetat und -formiat nicht beeinflusst, dagegen durch Aminosäuren und zwar durch Leucin deutlich gehemmt.

5. Sowohl die Acetyl- als auch die Formyl- und Benzoylderivate der Aminosäuren als auch die Hippursäure spaltenden Fermente werden durch Tonerde bei pH 3,4 am stärksten adsorbiert, durch Kaolin, Kieselgur und Tierkohle dagegen bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration gar nicht adsorbiert.

6. Die durch Tonerde adsorbierten, die Acetyl- und Formyl- und Benzoylderivate der Aminosäuren und Hippursäure spaltenden Fermente werden durch Ammoniumphosphatmischung eluiert.

7. Die Spaltung des Acetyl- und Benzoylglycins mit gereinigter Fermentlösung wird durch Zusatz von Natriumacetat und -formiat nicht beeinflusst, wohl aber durch die Aminosäuren und zwar durch Leucin.

8. Acetyl-, Formyl- und Benzoyl-dl-Phenylalanin werden durch Schweinsniere asymmetrisch gespalten. Als Spaltungsprodukte werden unverändertes Acetyl-, Formyl- und Benzoyl-dl-Phenylalanin und l-Phenylalanin als β -Naphthalinsulfonverbindung isoliert.

Aus diesen Ergebnissen konnte ich leider keinen sicheren Schluss ziehen, ob die Acetyl- und Formyl- und Benzoyl-aminosäuren spaltenden Fermente mit Histozymin identisch sind.

I) DER EINFLUSS DER WASSERSTOFFIONENKONZENTRATION AUF DIE
FERMENTATIVE SPALTUNG DER ACETYL-, FORMYL- UND
BENZOYLDERIVATE VON GLYCIN, dl-LEUCIN
UND dl-PHENYLALANIN.

Um die beliebige Wasserstoffionenkonzentration (pH 5,0–9,3) herzustellen, verwedete ich als Puffer die Phosphatmischung, Borat-Natronlauge- und Citrat-Salzsäuremischung.

Versuch mit Schweinspankreas.

1/160 Mol Hippursäure, Acetyl- und Formylglycin, Acetyl- und Formyl-dl-Leucin und Acetyl- und Formyl-dl-Phenylalanin wurden respektiv mit der berechneten Menge der n-Natronlauge neutralisiert, mit 5 ccm Pufferlösung, dann mit 2 ccm neutralisiertem Glycerinauszug versetzt und mit Wasser auf 25 ccm verdünnt. Dieses Gemisch wurde unter Toluolzusatz bei 37°C. digeriert.

TABELLE I.

pH	Std.	Zunahme d. Alkaliverbrauchs pro 5 ccm Verdauungs- flüssigkeit, n/10 Alkali in ccm.						
		Hippur- säure	Acetyl- glycin	Formyl- glycin	Acetyl- dl-Leucin	Formyl- dl-Leucin	Acetyl- dl-Phenylalanin	Formyl- dl-Phenylalanin
5,0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0	0
	44	0	0	0	0	0	0	0
	92	0	0	0,05	0	0	0,05	0
7,2	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	—	0,30	0	0,50	0,20	0,10	0,55
	44	0,05	0,80	0,15	0,55	0,40	0,25	0,55
	92	0,05	1,10	0,20	0	0,40	0,35	
9,3	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	0	0,10	0	0,20	0,05	0,05	0,30
	44	0	0,55	0	0,55	0,20	0	0,40
	92	0	0,75	0	0,50	0,15	0	0,35

Zur Kontrolle wurden 2 ccm neutralisierten Glycerinauszugs mit 5 ccm Pufferlösung versetzt, mit Wasser auf 25 ccm verdünnt und unter Toluolzusatz bei 37°C. digeriert.

Die Aciditätszunahme pro 5 ccm wurde nach Sörensen mit Formol titriert.

Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle I zusammengestellt.

Versuch mit Schweinsniere.

Diese Versuche wurden in gleicher Weise wie die obigen

TABELLE II.

pH	Std.	Zunahme d. Alkaliverbrauchs pro 5 ccm Verdauungsflüssigkeit, n/10 Alkali in ccm.							
		Hippur- säure	Acetyl- glycin	Formyl- glycin	Acetyl- dl-Leucin	Formyl- dl-Leucin	Acetyl- dl-Phenylalanin	Formyl- dl-Phenylalanin	Benzoyl- dl-Phenylalanin
5,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0,05	0	0	0	0
	8	0	0,05	0	0,10	0	0	0	0
	23	0	0,10	0	0,30	0	0	0	0
6,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0,10	1,15	0,40	0,55	0,45	0,15	0	0
	8	0,25	1,30	0,85	0,55	0,60	0,35	0,10	0,05
	25	0,55	1,20	1,25	0,50	0,55	0,55	0,20	0
7,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0,05	0,90	0,15	0,40	0,40	0,03	0	0
	8	0,25	1,30	0,80	0,65	0,60	0,40	0,15	0,05
	23	0,70	1,30	1,25	0,60	0,55	0,60	0,30	0
8,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0,05	1,00	0,25	0,45	0,30	0,10	0	0
	8	0,20	1,20	0,75	0,50	0,50	0,35	0,05	0
	23	0,65	1,20	1,15	0,60	0,55	0,60	0,30	0
9,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0,05	0,90	0,15	0,40	0,20	0,05	0	0
	8	0,15	1,10	0,50	0,45	0,40	0,28	0	0
	23	0,50	1,10	1,00	0,45	0,43	0,40	0,10	0

Versuche ausgeführt und die erhaltenen Resultate in Tabelle II zusammengestellt.

Versuch mit Schweinsleber.

Die Versuche wurden ganz in derselben Weise wie die obigen Versuche ausgeführt und die erhaltenen Resultate in Tabelle III zusammengestellt.

Wie aus Tabelle I, II und III zu ersehen, liegt das Optimal-pH

TABELLE III.

pH	Std.	Zunahme d. Alkaliverbrauchs pro 5 ccm Verdauungsflüssigkeit, n/10 Alkali in ccm.							
		Hippur- säure	Acetyl- glycin	Formyl- glycin	Acetyl- dl-Leucin	Formyl- dl-Leucin	Acetyl- dl-Phenylalanin	Formyl- dl-Phenylalanin	Benzoyl- dl-Phenyl- alanin
5,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0,03	0	0	0	0
	7	0	0,05	0	0,05	0	0	0	0
	22	0	0	0	0,15	0	0	0	0
6,4	0	0	0	0	0	0	0	0	—
	3	0,05	0,50	0,10	0,55	0,15	0,05	0	—
	7	0,10	0,90	0,25	0,60	0,35	0,15	0,05	—
	22	0,20	1,25	0,70	0,60	0,60	0,40	0,15	—
7,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0,05	,60	0,10	0,55	0,20	0,10	0	0
	7	0,10	1,05	0,30	0,60	0,40	0,20	0,05	0
	22	0,30	1,30	0,85	0,65	0,55	0,50	0,20	0,05
8,4	0	0	0	0	0	0	0	0	—
	3	0,05	0,55	0,10	0,45	0,15	0,05	0	—
	7	0,05	1,00	0,25	0,55	0,30	0,15	0,05	—
	22	0,25	1,15	0,70	0,50	0,45	0,35	0,05	—
9,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0,45	0,10	0,45	0,15	0,05	0	0
	7	0	0,90	0,15	0,45	0,25	0,10	0	0
	22	0,25	1,15	0,65	0,45	0,35	0,25	0	0

bei pH 7,2–6,4 und zeigt bei verschiedenen Acylaminosäuren keine beträchtliche Schwankung.

II) WIDERSTANDSFÄHIGKEIT DER ACETYLGLYCIN UND HIPPURSÄURE SPALTENDEN FERMENTE.

Zu diesen Versuchen wurde der Glycerinauszug von Niere, Leber, Pankreas und Darm des Schweins gebraucht und die Widerstandsfähigkeit der darin enthaltenen Acylaminosäuren spaltenden Fermente gegen Säuren und Alkalien und die Hitze untersucht.

1. *Die Widerstandsfähigkeit der Fermente gegen Säuren und Alkalien.*

Zur Untersuchung der Widerstandsfähigkeit der Fermente gegen Säuren und Alkalien wurde der Organglycerinauszug mit der zweifachen Menge Wasser verdünnt und gegen Lackmus mit n-Natronlauge genau neutralisiert. Der verdünnte, neutralisierte Glycerinauszug wurde mit n-Salzsäure oder n-Natronlauge im Bereich von pH 1–pH 12 versetzt und 20 Stunden im Eisschrank aufbewahrt. Danach wurden diese Auszüge mit n-Natronlauge oder n-Salzsäure neutralisiert und jede Portion unter Zusatz der berechneten Menge m-Kochsalzlösung auf gleiche Kochsalzkonzentration gebracht und die Wirksamkeit auf Acetylglycin und Hippursäure untersucht.

m/160 Acetylglycin resp. Hippursäure wurden unter Zusatz der berechneten Menge n-Natronlauge in Natriumsalz umgewandelt, mit 5 ccm neutraler Phosphatmischung und 10 ccm neutralisiertem Glycerinauszug versetzt und mit Wasser auf 25 ccm gebracht. Dieses Gemisch wurde unter Toluolzusatz bei 37°C. digeriert.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, sind die im Glycerinauszug enthaltenen Acetyl- und Benzoylglycin spaltenden Fermente bei 20 stündigem Stehen im Eisschrank gegen Säuren und Alkalien ziemlich widerstandsfähig, indem die Fermente bei pH 1, 2 und 12 in den meisten Fällen vernichtet sind.

TABELLE IV.

Zunahme d. Alkaliverbrauchs pro 5 ccm Verdauungs- flüssigkeit, n/10 Alkali in ccm.									
Organe	pH		Nach 6 Std.		Nach 28 Std.		Nach 76 Std.		
		0 Std.	Acetyl- glycin	Hippur- säure	Acetyl- glycin	Hippur- säure	Hippursäure		
Leber	1	0	0	0	0	0	0		
	2	0	0,95	0,05	1,25	0,37	0,85		
	3	0	0,88	0,05	1,25	0,30	0,85		
	5	0	0,90	0,05	1,23	0,30	0,90		
	7	0	0,85	0,05	1,20	0,30	0,85		
	9	0	0,85	0,05	1,25	0,28	0,85		
	12	0	0,65	0,05	1,20	0,25	0,80		
Niere (5 ccm Glycerin- auszug bewirkten die Spaltung.)			Nach 2 Std.		Nach 5 Std.		Nach 24 Std.		Nach 72 Std.
		0 Std.	Acetyl- glycin	Hippur- säure	Acetyl- glycin	Hippur- säure	Acetyl- glycin	Hippur- säure	Hippur- säure
	1	0	0		0	0	0	0	0
	2	0	0,08		0,32	0	1,15	0,05	0,20
	3	0	0,60		1,12	0,02	1,27	0,35	0,72
	5	0	0,58		1,05	0,02	1,20	0,33	0,70
	7	0	0,55		1,12	0,02	1,22	0,32	0,70
	9	0	0,52		1,02	0,02	1,20	0,30	0,70
	12	0	0,35		1,10	0,02	1,17	0,22	0,62
			Nach 22 Std.		Nach 46 Std.				
	0 Std.	Acetylglycin		Acetylglycin					
Pankreas	1	0	0		0				
	2	0	0,48		0,85				
	3	0	0,53		0,90				
	5	0	0,50		0,90				
	7	0	0,48		0,90				
	9	0	0,45		0,95				
	12	0	0,35		0,75				
Darm		0 Std.	Nach 24 Std.		Nach 72 Std.				
	1	0	0		0				
	2	0	0		0				
	3	0	0,10		0,25				
	5	0	0,10		0,25				
	7	0	0,10		0,25				
	9	0	0,05		0,25				
	12	0	0		0,05				

2. Widerstandsfähigkeit der Fermente gegen Hitze.

Der Organglycerinauszug wurde mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und gegen Lackmus mit n-Natronlauge neutralisiert. Dieser verdünnte Glycerinauszug wurde mit der halben

TABELLE V.

Orange	Temper.	Zunahme d. Alkaliverbrauchs pro 5 cem Verdauungs- flüssigkeit, n/10 Alkali in cem.						
		0 Std.	Nach 2 Std.		Nach 20 Std.		Nach 44 Std.	
			Acetyl- glycin	Hippur- säure	Acetyl- glycin	Hippur- säure	Acetyl- glycin	Hippur- säure
Niere	Ohne Erhitz.	0	0,65	0	1,20	0,55		1,10
	60°	0	0,65	0	1,25	0,45		1,00
	65	0	0,50	0	1,25	0,25		0,65
	70	0	0,15	0	1,10	0,03		0,20
	75	0	0	0	0,25	0	0,85	0
Leber	Ohne Erhitz.	0	0,30	0	1,25	0,30		0,80
	60°	0	0,40	0	1,25	0,15		0,60
	65	0	0,23	0	1,15	0,05		0,35
	70	0	0,10	0	0,92	0,08		0,15
	75	0	0	0	0,30	0	0,90	0
Pankreas	Ohne Erhitz.	0 Std.	Nach 24 Std.		Nach 48 Std.			
			Acetyl-glycin		Acetyl-glycin			
		0	0,75		0,95			
		60°	0,70		0,90			
		65	0,35		0,60			
		70	0,05		0,10			
Darm	Ohne Erhitz.	0 Std.	Nach 24 Std.		Nach 72 Std.			
			0,20		0,40			
		60°	0,10		0,23			
		65	0,03		0,08			
		70	0,02		0,06			
		75	0		0			

Menge m/15 Phosphatmischung (pH 7,2) versetzt und bei verschiedener Temperatur eine Stunde lang erhitzt.

Die Spaltungsversuche des Acetyl- und Benzoylglycins wurden wie bei den obigen Versuchen mit 5 ccm erhitztem Glycerinauszug ausgeführt und die Aciditätszunahme pro 5 ccm Digestionsgemisch mit Formol titriert.

Wie aus Tabelle V zu ersehen, ist die Wirkung des Organ-glycerinauszugs auf Acetyl- und Benzoylglycin durch einstündiges Erhitzen bei 65° und 70°C. deutlich herabgesetzt und bei 75°C. nicht mehr zu bemerken.

TABELLE VI.
Dem Digestionsgemisch Natriumacetat zugesetzt.

		Zunahme der verbrauchten n/10 Natronlauge pro 5 ccm Verdaunungsflüssigkeit in ccm.						
Std.		Hippur- säure	Acetyl- glycin	Formyl- glycin	Acetyl- dl-Leucin	Formyl- dl-Leucin	Acetyl- dl-Phenylalanin	Formyl- dl-Phenylalanin
Kontroll- versuch (nichts zugesetzt)	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	—	0,49	0,07	0,49	0,12	0,02	—
	5	0,09	1,07	0,27	0,55	0,37	0,12	0,05
	24	0,27	1,22	1,07	0,57	0,57	0,52	0,10
	72	0,62	—	—	—	—	—	0,20
m/40 Acetat	0	—	0	0	0	0	0	—
	2	—	0,47	0,07	0,52	0,17	0,05	—
	5	—	1,07	0,27	0,52	0,37	0,12	—
	24	—	1,22	1,07	0,57	0,57	0,47	—
m/20 Acetat	0	—	0	0	0	0	0	—
	2	—	0,45	0,07	0,47	0,12	0,02	—
	5	—	0,97	0,22	0,49	0,37	0,07	—
	24	—	1,22	0,92	0,55	0,57	0,47	—
m/10 Acetat	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	—	0,45	0,07	0,47	0,12	0,02	—
	5	0,07	1,07	0,29	0,47	0,32	0,10	0,05
	24	0,20	1,17	0,75	0,49	0,49	0,44	0,09
	72	0,50	—	—	—	—	—	0,17

III) HEMMUNG DER FERMENTATIVE SPALTUNG DER ACETYL-
UND FORMYLDERIVATE DER AMINOSÄUREN UND DER
HIPPURSÄURE DURCH IHRE SPALTUNGSPRODUKTE.

m/160 Acylaminosäuren wurden durch Zusatz von n-Natronlauge in Natriumsalz umgewandelt, mit einer bestimmten Menge der Spaltungsprodukte wie Natriumacetat, Natriumformiat, Aminosäuren und darauf mit 1 cem neutralisierten Schweinsnierenglycerinauszug versetzt, mit Wasser auf 25 cem verdünnt und unter Toluolzusatz bei 37°C. digeriert.

Die Aciditätszunahme wurde pro 5 cem Digestionsgemisch nach Sørensen mit Formol titriert.

Zur Kontrolle wurden die Acetyl- und Formylderivate von Glykokoll, dl-Leucin und dl-Phenylalanin ohne Zusatz von Spaltungsprodukte mit Schweinsnierenglycerinauszug digeriert.

TABELLE VII.

Dem Digestionsgemisch Natriumformiat zugesetzt.

		Zunahme der verbrauchten n/10 Natronlauge pro 5 cem Verdauungsflüssigkeit in cem.						
Std.		Hippur- säure	Acetyl- glycin	Formyl- glycin	Acetyl- dl-Leucin	Formyl- dl-Leucin	Acetyl- dl-Phenylalanin	Formyl- dl-Phenylalanin
Kontroll- versuch (nichts zugesetzt)	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	—	0,49	0,07	0,49	0,12	0,02	—
	5	0,09	1,07	0,27	0,55	0,37	0,12	0,05
	24	0,27	1,22	1,07	0,57	0,57	0,52	0,10
	72	0,62	—	—	—	—	—	0,20
m/40 Formiat	0	—	0	0	0	0	0	—
	2	—	0,47	0,02	0,47	0,15	0,02	—
	5	—	1,02	0,27	0,52	0,37	0,12	—
	24	—	1,22	0,97	0,57	0,55	0,47	—
m/20 Formiat	0	—	0	0	0	0	0	—
	2	—	0,37	0,02	0,47	0,12	0,02	—
	5	—	0,95	0,17	0,52	0,27	0,12	—
	24	—	1,22	0,87	0,55	0,52	0,42	—
m/10 Formiat	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0,07	0,45	0,07	0,47	0,12	0,02	0,05
	5	0,20	0,98	0,25	0,47	0,32	0,10	0,09
	24	0,50	1,15	0,87	0,47	0,47	0,47	0,17

TABELLE VIII.

Dem Digestionsgemisch Glykokoll zugesetzt.

		Zunahme der verbrauchten n/10 Natronlauge pro 5 ccm Verdaunungsflüssigkeit in ccm.						
	Std.	Hippur- säure	Acetyl- glycin	Formyl- glycin	Acetyl- dl-Leucin	Formyl- dl-Leucin	Acetyl- dl-Phenylalanin	Formyl- dl-Phenylalanin
Kontroll- versuch (nichts zugesetzt)	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	—	0,49	0,07	0,47	0,13	0,05	—
	5	0,09	1,12	0,22	0,52	0,39	0,17	0,05
	24	0,27	1,25	1,00	0,55	0,55	0,50	0,10
	72	0,62	—	—	—	—	—	0,20
m/40 Glykokoll	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	—	0,57	0,10	0,50	0,17	0,07	—
	5	0,10	1,12	0,29	0,50	0,37	0,17	0,05
	24	0,17	1,25	0,95	0,50	0,58	0,48	0,08
	72	0,39	—	—	—	—	—	0,17
m/20 Glykokoll	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	—	0,42	0,03	0,40	0,10	0,02	—
	5	0,05	0,90	0,20	0,40	0,30	0,15	0,03
	24	0,10	1,18	0,70	0,40	0,45	0,35	0,08
	72	0,20	—	—	—	—	—	0,13

TABELLE IX.

Dem Digestionsgemisch dl-Leucin zugesetzt.

		Zunahme der verbrauchten n/10 Natronlauge pro 5 ccm Verdaunungsflüssigkeit in ccm.						
	Std.	Hippur- säure	Acetyl- glycin	Formyl- glycin	Acetyl- dl-Leucin	Formyl- dl-Leucin	Acetyl- dl-Phenylalanin	Formyl- dl-Phenylalanin
Kontroll- versuch (nichts zugesetzt)	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	—	0,49	0,07	0,47	0,13	0,05	—
	5	0,09	1,12	0,32	0,52	0,39	0,17	0,05
	24	0,27	1,25	1,00	0,55	0,55	0,50	0,10
	72	0,62	—	—	—	—	—	0,20
m/40 dl-Leucin	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	—	0,30	0,03	0,40	0,05	0	—
	5	0,05	0,78	0,15	0,45	0,25	0,10	0
	24	0,10	1,18	0,55	0,45	0,45	0,30	0,05
	72	0,15	—	—	—	—	—	0,03

TABELLE X.

Dem Digestionsgemisch l-Leucin zugesetzt.

Std.		Zunahme der verbrauchten n/10 Natronlauge pro 5 cem Verdaunungsflüssigkeit in cem.						
		Hippur- säure	Acetyl- glycin	Formyl- glycin	Acetyl- dl-Leucin	Formyl- dl-Leucin	Acetyl- dl-Phenylalanin	Formyl- dl-Phenylalanin
Kontroll- versuch (nichts zugesetzt)	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	—	0,49	0,07	0,47	0,13	0,05	—
	5	0,09	1,12	0,32	0,52	0,39	0,17	0,05
	24	0,27	1,25	1,00	0,55	0,55	0,50	0,10
	72	0,62	—	—	—	—	—	0,20
m/40 dl-Leucin	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	—	0,25	0,05	0,40	0,05	0	—
	5	0,05	0,65	0,15	0,45	0,25	0,05	0
	24	0,10	1,18	0,47	0,45	0,45	0,25	0,05
	72	0,13	—	—	—	—	—	0,03

TABELLE XI.

Dem Digestionsgemisch dl-Phenylalanin zugesetzt.

Std.		Zunahme der verbrauchten n/10 Natronlauge pro 5 cem Verdaunungsflüssigkeit in cem.						
		Hippur- säure	Acetyl- glycin	Formyl- glycin	Acetyl- dl-Leucin	Formyl- dl-Leucin	Acetyl- dl-Phenylalanin	Formyl- dl-Phenylalanin
Kontroll- versuch (nichts zugesetzt)	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	—	0,49	0,07	0,47	0,13	0,05	—
	5	0,09	1,12	0,32	0,52	0,39	0,17	0,05
	24	0,27	1,25	1,00	0,55	0,55	0,50	0,10
	72	0,62	—	—	—	—	—	0,20
m/40 dl-Phenyl- alanin	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	—	0,48	0,08	0,10	0,45	0,06	—
	5	0,05	0,95	0,18	0,25	0,45	0,08	0
	24	0,10	1,17	0,68	0,45	0,45	0,38	0,05
	72	0,30	—	—	—	—	—	0,15

Wie aus Tabelle VI–XI ersichtlich, wird die Spaltung der Acetyl- und Formylderivate von Glykokoll, dl-Leucin und dl-Phenylalanin mit Schweinsnierenglycerinauszug durch Zusatz von Natriumacetat und Natriumformiat kaum beeinflusst, dagegen durch Aminosäuren und zwar durch dl- und l-Leucin deutlich gehemmt. Das zugesetzte Leucin wirkt aber nicht auf die Acetyl-

und Formylderivate von Leucin, sondern auf die Derivate von Glykokoll und dl-Phenylalanin.

IV) ADSORPTIONSVERHALTEN DER ACETYLDERIVATE DER AMINO-
SÄUREN UND HIPPURSÄURE SPALTENDEN FERMENTE BEI
VERSCHIEDENER WASSERSTOFFIONENKONZENTRATION.

Dass die Fermente als kolloide Substanzen bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration durch verschiedene Adsorbentien, und zwar ein bestimmtes Ferment bei einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration durch ein bestimmtes Adsorbens, adsorbiert werden, ist eine wohl bekannte Tatsache. Um festzustellen, ob das Acylaminosäuren spaltende Ferment ein gleiches Adsorptionsverhalten wie Histozyim zeigt, und um dadurch die Identität beider Fermente aufzuklären, stellte ich folgende Versuche an.

Der Glycerinauszug von Schweinsniere wurde nach der Verdünnung mit der doppelten Menge Wasser gegen Lackmus neutralisiert und zentrifugiert. Die obere, fast klare Schicht wurde durch Zusatz von n-Essigsäure und n-Ammoniak auf eine beliebige Wasserstoffionenkonzentration im Bereiche von pH 3,4–10,7 gebracht und mit verschiedenen Adsorbentien wie Kaolin, Kieselgur, Tierkohle und Tonerde versetzt. Nach einer Stunde wurde die Mischung scharf abgenutscht, das Filtrat gegen Lackmus genau neutralisiert und zur Spaltung der Aminosäuren verwendet.

1/160 Mol Acetylaminosäuren wurden in Natriumsalz übergeführt und mit 5 ccm neutraler Phosphatmischung und 5 ccm Adsorptionsrestlösung versetzt und mit Wasser auf 25 ccm gebracht.

Zur Kontrolle wurde ein verdünnter Glycerinauszug unter gleicher Wasserstoffionenkonzentration wie beim Adsorptionsversuch eine Stunde lang stehen gelassen, darauf gegen Lackmus genau neutralisiert und seine Wirkung auf Acetylaminosäuren und Hippursäure untersucht.

Die Aciditätszunahme wurde nach Sörensen mit Formol titriert.

TABELLE XII.

Spaltung des Acetylglycins durch Adsorptionsrestlösung.

Die Acidität bei der Adsorption pH	Adsorbens	Zunahme d. Alkaliverbrauchs pro 5 cem Verdauungs- flüssigkeit, n/10 Alkali in cem.			
		0 Std.	Nach 2 Std.	Nach 4 Std.	Nach 19 Std.
3,4	Nicht adsorbiert	0	0,50	—	1,30
	5% Kieselgur	0	0,38	—	1,31
	5% Tierkohle	0	0,32	—	1,35
	1,5% Kaolin	0	0,50	—	1,20
	Tonerde (0,1% Al_2O_3)	0	0,07	—	0,55
4,5	Nicht adsorbiert	0	0,48	—	1,24
	5% Kieselgur	0	0,33	—	1,20
	5% Tierkohle	0	0,25	—	1,23
	1,5% Kaolin	0	0,45	—	1,20
	Tonerde (0,1% Al_2O_3)	0	0,22	—	1,17
5,6	Nicht adsorbiert	0	0,33	—	1,20
	5% Kieselgur	0	0,32	—	1,10
	5% Tierkohle	0	0,30	—	1,20
	1,5% Kaolin	0	0,33	—	1,18
	Tonerde (0,1% Al_2O_3)	0	0,20	—	1,15
7,2	Nicht adsorbiert	0	0,30	1,00	1,30
	5% Kieselgur	0	—	0,95	1,28
	5% Tierkohle	0	0,31	—	1,32
	1,5% Kaolin	0	0,35	—	1,30
	Tonerde (0,1% Al_2O_3)	0	0,13	—	1,23
10,7	Nicht adsorbiert	0	0,25	—	1,23
	5% Kieselgur	0	0,22	—	1,18
	5% Tierkohle	0	0,23	—	1,23
	1,5% Kaolin	0	0,25	—	1,25
	Tonerde (0,1% Al_2O_3)	0	0,15	—	1,25

TABELLE XIII.

Spaltung des Acetyl-dl-Leucins durch Adsorptionsrestlösung.

Die Acidität bei der Adsorption. pH	Adsorbens	Zunahme d. Alkaliverbrauchs pro 5 cem Verdauungsflüssigkeit, n/10 Alkali in cem.		
		0 Std.	Nach 2 Std.	Nach 19 Std.
3,4	Nicht adsorbiert	0	0,55	0,55
	5% Kieselgur	0	0,45	0,52
	5% Tierkohle	0	0,50	0,52
	1,5% Kaolin	0	0,55	0,53
	Tonerde (0,1% Al_2O_3)	0	0,10	0,55
4,5	Nicht adsorbiert	0	0,60	—
	5% Kieselgur	0	0,55	—
	5% Tierkohle	0	0,60	—
	1,5% Kaolin	0	—	—
	Tonerde (0,1% Al_2O_3)	0	0,40	—
7,0	Nicht adsorbiert	0	0,45	0,60
	5% Kieselgur	0	0,43	0,50
	5% Tierkohle	0	0,45	0,55
	1,5% Kaolin	0	0,40	0,60
	Tonerde (0,1% Al_2O_3)	0	0,40	0,50
10,7	Nicht adsorbiert	0	0,60	0,60
	5% Kieselgur	0	0,60	0,55
	5% Tierkohle	0	0,53	0,52
	1,5% Kaolin	0	0,60	0,58
	Tonerde (0,1% Al_2O_3)	0	0,50	0,60

TABELLE XIV.

Spaltung des Acetyl-dl-Phenylalanins durch Adsorptionsrestlösung.

Die Acidität bei der Adsorption. pH	Adsorbens	Zunahme d. Alkaliverbrauchs pro 5 cem Verdauungsflüssigkeit, n/10 Alkali in cem.		
		0 Std.	Nach 19 Std.	Nach 67 Std.
3,4	Nicht adsorbiert	0	0,43	0,60
	5% Kieselgur	0	0,20	0,50
	5% Tierkohle	0	0,32	0,62
	1,5% Kaolin	0	0,40	0,60
	Tonerde (0,1% Al_2O_3)	0	0,02	0,10
4,7	Nicht adsorbiert	0	0,25	0,60
	5% Kieselgur	0	0,30	0,52
	5% Tierkohle	0	0,30	0,50
	Tonerde (0,1% Al_2O_3)	0	0,10	0,25
7,2	Nicht adsorbiert	0	0,35	—
	5% Kieselgur	0	0,35	—
	5% Tierkohle	0	0,30	—
	1,5% Kaolin	0	0,40	—
	Tonerde (0,1% Al_2O_3)	0	0,20	—
10,7	Nicht adsorbiert	0	0,45	0,60
	5% Kieselgur	0	0,45	0,65
	5% Tierkohle	0	0,30	0,55
	1,5% Kaolin	0	0,40	0,60
	Tonerde (0,1% Al_2O_3)	0	0,40	0,60

TABELLE XV.

Spaltung der Hippursäure durch Adsorptionsrestlösung.

Die Acidität bei der Adsorption. pH	Adsorbens	Zunahme d. Alkaliverbrauchs pro 5 ccm Verdauungsflüssigkeit, n/10 Alkali in ccm.		
		0 Std.	Nach 19 Std.	Nach 57 Std.
3,4	Nicht adsorbiert	0	0,23	0,35
	5% Kieselgur	0	0,09	0,27
	5% Tierkohle	0	0,14	0,20
	1,5% Kaolin	0	0,10	0,35
	Tonerde(0,1% Al_2O_3)	0	0,05	0,05
4,5	Nicht adsorbiert	0	0,10	0,35
	5% Kieselgur	0	0,10	0,23
	5% Tierkohle	0	0,10	0,25
	1,5% Kaolin	0	0,12	0,35
	Tonerde(0,1% Al_2O_3)	0	0,10	0,15
5,6	Nicht adsorbiert	0	0,20	0,50
	5% Kieselgur	0	0,15	0,50
	5% Tierkohle	0	0,18	0,30
	1,5% Kaolin	0	0,20	0,50
	Tonerde(0,1% Al_2O_3)	0	0,18	0,30
7,2	Nicht adsorbiert	0	0,13	0,50
	5% Kieselgur	0	0,11	0,46
	5% Tierkohle	0	0,10	0,40
	1,5% Kaolin	0	0,13	0,44
	Tonerde(0,1% Al_2O_3)	0	0,10	0,25
10,7	Nicht adsorbiert	0	0,10	0,35
	5% Kieselgur	0	0,10	0,35
	5% Tierkohle	0	0,07	0,22
	1,5% Kaolin	0	0,10	0,32
	Tonerde(0,1% Al_2O_3)	0	0,15	0,30

TABELLE XVI.

Spaltung der Acetylderivate von Glycin, dl-Leucin und dl-Phenylalanin durch Adsorptionsrestlösung des Schweinspankreasglycerinauszugs.

Adsorbens	Acidität bei der Adsorp- tion. pH	Std.	Zunahme d. Alkaliverbrauchs pro 5 cem Verdauungsflüssigkeit, n/10 Alkali in cem.		
			Acetyl- glycin	Acetyl-dl- Leucin	Acetyl-dl- Phenylalanin
Nicht adsorbiert	3.4	0	0	0	0
		17	0,35	0,43	0,05
		89	0,98	0,50	0,30
5% Kieselgur	„	0	0	0	0
		17	0,30	0,42	0,05
		89	0,90	0,50	0,30
5% Tierkohle	„	0	0	0	0
		17	0,30	0,43	0,10
		89	0,80	0,53	0,30
Tonerde (0,1% Al ₂ O ₃)	„	0	0	0	0
		17	0,30	0,45	0,05
		89	0,95	0,53	0,28
Nicht adsorbiert	10,7	0	0	0	0
		17	0,20	0,33	0
		65	0,80	0,60	0,12
		103	—	—	0,20
5% Tierkohle	„	0	0	0	0
		17	0,15	0,30	0,05
		65	0,65	0,50	0,20
		103	—	—	0,33
1,5% Kaolin	„	0	0	0	0
		17	0,20	0,35	—
		65	0,70	0,53	0,05
		120	—	—	0,12
Tonerde (0,1% Al ₂ O ₃)	„	0	0	0	0
		17	0,28	0,45	0,08
		65	0,70	0,50	0,05
		120	—	—	0,15

Das Adsorptionsverhalten der Fermente, die in Pankreas und Leber des Schweins enthalten und Acylaminosäuren zu spalten imstande sind, wurde in ganz gleicher Weise wie bei den obigen Versuchen untersucht und die erhaltenen Resultate in Tabellen XVI und XVII zusammengestellt.

TABELLE XVII.

Spaltung der Acetylderivate von Glycin, dl-Leucin und dl-Phenylalanin und der Hippursäure durch Adsorptionsrestlösung d. Schweinsleberglycerinauszugs.

Adsorbens	Acidität bei der Adsorp- tion. pH	Std.	Zunahme d. Alkaliverbrauchs pro 5 cem Verdauungsflüssigkeit, n/10 Alkali in cem.			
			Acetyl- glycin	Acetyl-dl- Leucin	Acetyl-dl- Phenyl- alanin	Hippur- säure
Nicht adsorbiert	3,4	0	0	0	0	0
		2	0,15	0,30	—	—
		15	1,00	0,50	0,10	0,03
		63	—	—	0,40	0,20
5% Kieselgur	„	0	0	0	0	0
		2	0,05	0,20	—	—
		15	0,90	0,50	0,05	0,05
		63	—	—	0,30	0,20
5% Tierkohle	„	0	0	0	0	0
		2	0,10	0,25	—	—
		15	0,95	0,45	0,10	0,02
		63	—	—	0,40	0,10
1,5% Kaolin	„	0	0	0	0	0
		2	0,10	0,30	—	—
		15	1,08	0,50	0,10	0
		63	—	—	0,45	0,20
Tonerde (0,1% Al ₂ O ₃)	„	0	0	0	0	0
		2	0	0,02	—	—
		15	0,30	0,45	0	0
		63	—	—	0,13	0

Wie aus Tabelle XII–XVII ersichtlich, werden die Acetylaminosäuren spaltenden Fermente durch Tonerde bei pH 3,4 am stärksten adsorbiert, dagegen durch Kaolin und sonstige Adsorbentien bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration gar nicht.

Beim Versuch mit Schweinspankreasglycerinauszug wirkt die Adsorptionsrestlösung ebenso stark wie nicht adsorbierter Glycerinauszug. Versetzt man die wirksame Adsorptionsrestlösung nochmals bei pH 3,4 mit Tonerde, so ist das Filtrat (Adsorptionsrestlösung II) fast wirkungslos auf Acetylglycin, wie Tabelle XVIII zeigt.

TABELLE XVIII.

Spaltung des Acetylglycins durch Adsorptionsrestlösung des Schweinspankreasglycerinauszugs.

	Acidität bei der Adsorption	Zunahme d. Alkaliverbrauch pro 5ccm Verdauungsflüssigkeit. n/10 Alkali in ccm.		
		0 Std.	Nach 20 Std.	Nach 44 Std.
Nicht adsorbiert	pH 3,4	0	0,45	0,93
I. Restlösung eimal mit Tonerde (0,1% Al_2O_3) adsorbiert	„	0	0,45	0,95
II. Restlösung zweimal mit Tonerde (0,1% Al_2O_3) adsorbiert	„	0	0,05	0,05

V) SPALTUNG DER ACETYLAMINOSÄUREN UND HIPPURSÄURE DURCH ELUAT.

Aus den oben angegebenen Versuchen ist sichergestellt, dass die durch Behandeln des Organglycerinauszugs mit Tonerde bei pH 3,4 erhaltene Adsorptionsrestlösung keine ebenso stark hydrolysierende Wirkung auf Acetylglycin mehr aufweist, wie die des nicht behandelten Glycerinauszugs. Ob die herabgesetzte spal-

tende Wirkung durch Adsorption der Fermente hervorgerufen ist, lässt sich durch die Untersuchung des Eluates feststellen.

10 cem Nierenglycerinauszug wurden nach Verdünnen mit der doppelten Menge Wasser gegen Lackmus neutralisiert und mit 1 g Kieselgur versetzt und scharf abgenutscht. Das klare Filtrat wurde auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und ein Teil desselben zur Spaltung der Acylaminosäure gebraucht. Der Hauptteil der Lösung wurde bei Anwesenheit von n/100 Essigsäure mit einer 0,1% Al_2O_3 entsprechenden Tonerde versetzt und nach einer Stunde zentrifugiert. Die klare Lösung (Adsorptionsrestlösung) wurde nach Auffüllen auf ein bestimmtes Volumen mit ihrem aliquoten Teil zur Spaltung der Acylaminosäuren verwendet. Das Adsorbat wurde nach Abwaschen mit 20%igem wässerigen Glycerin mit Ammoniumphosphatmischung nach Willstätter

TABELLE XIX.

	Std.	Zunahme d. Alkaliverbrauchs pro 5cem Verdauungsflüssigkeit, n/10 Alkali in cem.	
		Acetylglycin	Hippursäure
Nicht adsorbiert	0	0	0
	2	0,54	0,02
	18	1,15	0,30
	42	—	0,75
Restlösung	0	0	0
	2	0,10	0
	18	0,60	0
	42	1,00	0,05
Eluat	0	0	0
	2	0,50	0
	18	1,15	0,25
	42	—	0,40

eluiert. Das Eluat wurde auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und der aliquote Teil zum Versuch verwendet.

Das Reaktionsgemisch, das in 25 ccm m/160 Acetyl-glycin resp. Hippursäure im Natriumsalze, 5 ccm m/15 Phosphatpuffer und 5 ccm Fermentlösung enthält, wurde unter Zusatz von Toluol bei 37°C. digeriert und die Aciditätszunahme pro 5 ccm nach Sörensen mit Formol titriert.

Die Resultate sind in Tabelle XIX zusammengestellt.

Aus Tabelle XIX ist zu ersehen, dass die Acetyl- und Benzoyl-glycin spaltenden Fermente durch Ammoniumphosphatmischung aus der Tonerde eluiert werden.

VI) HEMMUNG DER MITTELS GEREINIGTER FERMENTLÖSUNG BEWIRKTEN SPALTUNG VON ACETYL- UND BENZOYLGLYCIN DURCH DIE DABEI ENTSTEHENDEN SPALTUNGSPRODUKTE.

Wie oben angegeben, wirken die Spaltungsprodukte wie Natriumacetat, Natriumformiat und verschiedene Aminosäuren auf die fermentative Spaltung der Acylaminosäuren nicht spezifisch hemmend. Die Hemmung der Fermentwirkung wird aber durch die Anwesenheit von Begleitstoffen beträchtlich beeinflusst. Da mir die Reinigung der Acylaminosäuren spaltenden Fermente durch Adsorbieren mit Tonerde bei pH 3,4 und darauf durch Eluieren mit Ammoniumphosphatmischung gelungen, so stellte ich denselben Hemmungsversuch nochmals mit gereinigter Fermentlösung an.

Wie aus Tabelle XX ersichtlich, wirken Natriumacetat und Natriumformiat auf die durch gereinigte Fermente bewirkte Spaltung des Acetyl- und Benzoylglycins nicht hemmend. Der Zusatz von Aminosäuren und zwar von Leucin hemmt dagegen deutlich die Spaltung des Acetyl- und Benzoylglycins. Aus diesen Ergebnissen allein ist aber über die Identität des die Acetylaminosäuren spaltenden Fermentes mit Histozyim kein sicherer Schluss zu ziehen.

TABELLE XX.

	Zunahme d. Alkaliverbrauch pro 5 cem Verdauungsflüssigkeit, n/10 Alkali in cem.					
	Acetylglycin			Hippursäure		
	0 Std.	2 Std.	20 Std.	0 Std.	20 Std.	44 Std.
Nichts zugesetzt	0	0,12	1,10	0	0,18	0,40
m/40 Natriumacetat	0	0,40	1,10	0	0,15	0,35
m/40 Natriumformiat	0	0,40	1,10	0	0,15	0,35
m/40 Glykokoll	0	0,45	1,15	0	0,15	0,33
m/80 dl-Leucin	0	0,35	1,15	0	0,15	0,40
m/80 dl-Phenylalanin	0	0,45	1,20	0	0,20	0,50
m/80 dl-Leucin	0	0,45	1,15	0	0,20	0,45
Nichts zugesetzt	0	0,50	1,10	0	0,22	0,55
m/20 Natriumacetat	0	0,50	1,10	0	0,20	0,50
m/20 Natriumformiat	0	0,42	1,10	0	0,18	0,45
m/20 Glykokoll	0	0,38	1,20	0	0,10	0,30
m/40 dl-Leucin	0	0,28	1,10	0	0,10	0,25
m/40 dl-Phenylalanin	0	0,40	1,17	0	0,17	0,37
m/40 l-Leucin	0	0,28	1,05	0	0,05	0,25
Nichts zugesetzt	0	0,65	1,15	0	0,30	0,55
m/10 Natriumacetat	0	0,50	1,05	0	0,20	0,35
m/10 Natriumformiat	0	0,50	1,05	0	0,22	0,42

VII) UNTERSUCHUNG DER SPALTUNGSPRODUKTE VON ACETYL-, FORMYL- UND BENZOYL-DL-PHENYLALANIN.

Acetyl-dl-Phenylalanin:

2,08 g Acetyl-dl-Phenylalanin wurden mit der berechneten Menge n-Natronlauge in Lösung übergeführt, mit 16 cem Glycerin-
auszug aus Schweinsniere, 90 cem m/15 Phosphatpuffer und
300 cem Wasser versetzt und darauf unter Toluolzusatz bei 37°C
digeriert. Nach 5 Tagen wurde dieser Mischung die berechnete
Menge n-Salzsäure hinzugefügt und mit Äther extrahiert. Nach

Abdunsten des Äthers wurde der Rückstand aus heissem Wasser umkrystallisiert. Ausbeute 0,83 g. Die erhaltenen Krystalle schmolzen bei 171°C (unkorr.) und ergaben die folgenden mit Acetylphenylalanin übereinstimmenden Analysenzahlen.

0,1018 g Substanz brauchten zur Neutralisation des Ammoniaks
4,86 ccm n/10 H₂SO₄;

Berechnet für C₁₁H₁₃NO₃ 6,76% N.

Gefunden 6,69% N.

Die alkoholische Lösung, die in 15 ccm 0,2690 g Krystalle enthielt, drehte im 2 dm-Rohr und bei Natriumlicht die Ebene des polarisierten Lichtes 1,65° nach links.

Also $[\alpha]_D^{20} = -46,09^\circ$.

Die mit Äther extrahierte wässrige Lösung wurde mit Natronlauge alkalisch gemacht und die Aminosäure in der üblichen Weise in β -Naphthalinsulfoverbindung übergeführt. Die aus heissem Wasser umkrystallisierte Substanz wog 1,46 g und schmolz bei 147°C (unkorr.). Die Analysenwerte stimmen mit denen von β -Naphthalinsulfophenylalanin gut überein.

0,2196 g Substanz brauchten zur Neutralisation des Ammoniaks
6,42 ccm n/10 H₂SO₄;

Berechnet für C₁₉H₁₇SO₄N 3,94% N.

Gefunden 4,10% N.

Die alkoholische Lösung, die in 25 ccm 0,2352 g Krystalle enthielt, drehte im 2 dm-Rohr und bei Natriumlicht die Ebene des polarisierten Lichtes 0,14° nach links.

Also $[\alpha]_D^{14} = -7,44^\circ$.

Beim Digerieren des 0,52 g Acetyl-dl-Phenylalanins mit Hundsnieren wurden 0,18 g Acetyl-d-Phenylalanin (Schmelzp. 170,5°C) und 0,16 g β -Naphthalinsulfo-l-Phenylalanin (Schmelzp. 145°C) nach demselben Verfahren wie beim Versuch mit Schweinsniere dargestellt. Diese Verbindungen gaben folgende Analysenwerte:

Acetyl-d-Phenylalanin:

0,1330 g Substanz brauchten zur Neutralisation des Ammoniaks
6,41 ccm n/10 H_2SO_4 ;

Berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ 6,76% N.

Gefunden 6,75% N.

Die alkoholische Lösung, die 0,1606 g Substanz in 15 ccm enthielt, drehte im 2 dm-Rohr und bei Natriumlicht die Ebene des polarisierten Lichtes $1,00^\circ$ nach links.

Also $[\alpha]_D^{14} = -46,72^\circ$.

β -Naphthalinsulfo-l-Phenylalanin:

0,1160 g Substanz brauchten zur Neutralisation des Ammoniaks
3,35 ccm n/10 H_2SO_4 ;

Berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{SO}_4\text{N}$ 3,94% N.

Gefunden 4,05% N.

Die alkoholische Lösung, die 0,1214 g Substanz in 15 ccm enthielt, drehte im 2 dm-Rohr und bei Natriumlicht die Ebene des polarisierten Lichtes $0,10^\circ$ nach links.

Also $[\alpha]_D^{14} = -6,18^\circ$.

Benzoyl-dl-Phenylalanin:

2,7 g Benzoyl-dl-Phenylalanin wurden in ganz gleicher Weise bei 37°C . unter Toluolzusatz mit Hundsniere digeriert.

1,24 g Benzoyl-d-Phenylalanin (Schmelzp. 181°C) und 0,34 g β -Naphthalinsulfo-l-Phenylalanin (Schmelzp. 147°C .) wurden wie bei Acetyl-dl-Phenylalanin dargestellt und gaben folgende Analysenwerte:

Benzoyl-d-Phenylalanin:

0,1206 g Substanz brauchten zur Neutralisation des Ammoniaks
4,25 ccm n/10 H_2SO_4 ;

Berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{N}$ 5,21% N.

Gefunden 4,94% N.

Die wässrige Lösung, die in 25 ccm 0,4502 g vorher mit

n-Natronlauge in Lösung übergeführter Substanz¹ enthielt, drehte im 2 dm-Rohr und bei Natriumlicht die Ebene des polarisierten Lichtes $0,12^\circ$ nach links.

$$\text{Also } [\alpha]_D^{14} = -3,31^\circ.$$

β -Naphthalinsulfo-l-Phenylalanin:

0,1456 g Substanz brauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 4,35 ccm n/10 H_2SO_4 ;

Berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{SO}_4\text{N}$ 3,94% N.

Gefunden 4,19% N.

Die alkoholische Lösung, die 0,1230 g Substanz in 15 ccm enthielt, drehte im 2 dm-Rohr und bei Natriumlicht die Ebene des polarisierten Lichtes $0,11^\circ$ nach links.

$$\text{Also } [\alpha]_D^{14} = -6,71^\circ.$$

Formyl-dl-Phenylalanin:

1,9 g Formyl-dl-Phenylalanin wurden unter Toluolzusatz mit Hundsniere bei 37°C . digeriert. Aus der Verdauungsflüssigkeit wurden in ganz gleicher Weise 0,49 g Formyl-d-Phenylalanin (Schmelzp. $166,5^\circ\text{C}$.) dargestellt.

Formyl-d-Phenylalanin:

0,0864 g Substanz brauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 4,54 ccm n/10 H_2SO_4 ;

Berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}$ 7,26% N.

Gefunden 7,36% N.

Die alkoholische Lösung, die 0,1304 g Substanz in 15 ccm enthielt, drehte im 2 dm-Rohr und bei Natriumlicht die Ebene des polarisierten Lichtes $1,30^\circ$ nach links.

$$\text{Also } [\alpha]_D^{13} = -74,8^\circ.$$

STUDIES ON PROTAMINE (I).

By

RYOZO HIROHATA.

(From the Medico-chem. Department,, Gov. Med. College, Formosa.)

(Received for publication, November 15, 1928.)

I. INTRODUCTION.

Since the extensive work of A. Kossel and his co-workers "the protamine" has become one of the most interesting subjects in the field of protein research. Intending to make some experiments on the constitution, physiological actions etc. of this, by A. Kossel the so-called "simplest" and "protein-nucleus" forming protein, I succeeded in isolating a new protamine from the sperm of the Formosan mullet or "Bora" identified by M. Oshima (1921) as *Mugil japonicus Temminck and Schlegel*. The "bora" comes in large schools during the winter months to the western coast of Formosa, especially of the Tainan and Takao districts, probably for spawning, and its salted roe, called "Karasumi," makes a highly prized dish for Japanese and Chinese alike. In the latter part of the season the testicles of the "bora" are quite ripe and about 16-25 cm. long, weighing 100-150 gm. and are easily obtainable in quantity at Takao and Toko.

The protamine hitherto described were isolated chiefly from the sperms of Acanthopterygii, Malacopterygii, Haplomi, Ostariophysi and Anacanthini, and, at the time when I took up this study, none had previously been reported from the Percesoces or Mugiliformes (a suborder of the Subclass Teleostei). For these reasons I considered the testicles of the "bora" as suitable and interesting objects for further studies.

Lately Prof. M. Yamakawa (1926) reported on a new protamine isolated from Mugil "cephalus" obtained at Nagasaki and

Chishima, and named it "Mugiline," but it seems to me that this is somewhat different from mine, the reason for which might be due to the difference of source, especially climatic conditions.

II. ISOLATION AND PURIFICATION.

The sulphate was isolated and purified chiefly according to A. Kossel's (1896, 1898) and M. Nelson-Gerhardt's (1919) methods which are as follows. Ripe and fresh testicles, packed in ice and sent from Takao in December and January of 1922 and 1923, were freed from adhering fibrous tissues, ground finely, macerated with water, and filtered through cloth; from the resulting milky filtrate the protein was precipitated with dilute acetic acid, left standing for several hours, and the supernatant fluid decanted. After filtering through folded paper, the residue was boiled several times with alcohol, filtered while hot, further extracted with ether in Soxhlet's apparatus, and finally dried in vacuo with paraffin over sulphuric acid. The protein mixture thus obtained was a light powder amounting to 10-13% of the raw testicle and contained 18.92% of nitrogen on an average. This powder was then extracted with 1% sulphuric acid 3-4 times in succession, and the resulting protamine sulphate precipitated with alcohol and ether, and dried in a vacuum desiccator; this crude protamine sulphate amounted to 15-16% of the dried and defatted protein mixture of the testicle.

For further purification dissolution in hot water and precipitation with alcohol were repeated several times; then it was dissolved in water and digested with pepsin and dilute hydrochloric acid for 24-48 hours at 37°C., neutralized with sodium carbonate solution, filtered, precipitated with sodium picrate, as protamine picrate, and the sulphate regained with acetone and sulphuric acid, precipitated with alcohol; dissolution and precipitation were repeated until a flocculent precipitate was obtained; after this followed decanting, and thorough washing with ether and drying as usual.

III. PROPERTIES.

The protamine sulphate is a light, white powder with an insipid taste and shows the following reactions, pr. indicating precipitation, while + and — the positive and negative colour reactions.

sodium chloride: pr.,	ammonium sulphate: pr.,
magnesium sulphate: no pr.,	potassium chromate: pr.,
copper sulphate: no pr.,	ferric chloride: pr., sol. in excess,
lead acetate: pr.,	basic lead acetate: pr.,
mercuric chloride: no pr.,	mercuric sulphate: no pr.,
silver nitrate: no pr.,	sulphosalicylic acid: pr.,
trichloroacetic acid: pr.,	nitric acid: no pr.,
phosphotungstic acid: pr.,	hydroferrocyanic acid: pr.,
potassium mercuric iodide: pr.,	ammonia: no pr.,
ammoniated protein solution: pr.,	sodium hydroxide: pr.,
xanthoproteic: (—),	Millon: (—),
Hopkins-Cole: (—),	Neubauer-Rohde: (—),
Sakaguchi: (+),	Pauly: (—),
sulphur: (—),	biuret: (+).

The protamine chloroplatinate was prepared from the sulphate, precisely following M. Goto (1902), and analysed.

Sample I.

0.1092 gm. substance gave 0.0984 gm. CO_2 =24.57% C, and 0.0448 gm. H_2O =4.59% H.

0.1397 gm. substance gave 0.1243 gm. CO_2 =24.27% C, and 0.0554 gm. H_2O =4.44% H.

0.1637 gm. substance gave 21.5 ccm N_2 at 20°C. and 767 mm Hg=15.10% N.

0.1647 gm. substance gave 21.4 ccm N_2 at 20°C. and 768 mm Hg=14.96% N.

0.1942 gm. substance gave 0.0434 gm. Pt=22.35% Pt, and 0.1986 gm. AgCl=25.30% Cl.

0.1218 gm. substance gave 0.0270 gm. Pt=22.17% Pt, and 0.1242 gm. AgCl=25.23% Cl.

Sample II.

0.1260 gm. substance gave 0.1152 gm. CO₂=24.94% C, and 0.0480 gm. H₂O=4.26% H.

0.1141 gm. substance gave 0.1047 gm. CO₂=25.03% C, and 0.0442 gm. H₂O=4.33% H.

0.1370 gm. substance gave 18.2 ccm N₂ at 24°C, and 764 mm Hg=14.91% N.

0.1330 gm. substance gave 17.5 ccm N₂ at=24°C, and 766 mm Hg=14.80% N.

0.1721 gm. substance gave 0.0374 gm. Pt=21.73% Pt, and 0.1756 gm. AgCl=25.24% Cl.

0.1675 gm. substance gave 0.0362 gm. Pt=21.61% Pt, and 0.1704 gm. AgCl=25.17% Cl.

Tabulated, the results are as follows:

	Sample I		Sample II		Average
C	24.57	24.27	24.94	25.03	24.68
H	4.59	4.44	4.26	4.33	4.40
N	15.10	14.96	14.91	14.80	14.95
Pt	22.35	22.17	21.73	21.61	21.96
Cl	25.30	25.23	25.24	25.17	25.24
O					8.77

The empirical formula, therefore, is $C_{36}H_{76}N_{19}O_{10} \cdot 4HCl + 2PtCl_4$.

	calculated as $C_{36}H_{76}N_{19}O_{10} \cdot 4HCl + 2PtCl_4$,	found
C	24.62	24.68
H	4.60	4.40
N	15.17	14.95
Pt	22.25	21.96
Cl	24.25	25.24
O	9.11	8.77

The sulphate contains 18.15% H_2SO_4 , and 23.30% N in total, of which 1.48% is amino-N to be liberated as N_2 by Van Slyke's method.

The specific rotation has also been measured with the following results.

$$\left. \begin{aligned} [\alpha]_D^{20} &= \frac{-6.43^\circ \times 100}{3.9803 \times 2} = -80.77^\circ \\ [\alpha]_D^{20} &= \frac{-6.73 \times 100}{4.1210 \times 2} = -81.65^\circ \end{aligned} \right\} \text{average } [\alpha]_D^{20} = -81.21^\circ.$$

IV. THE DISTRIBUTION OF NITROGEN.

5.6600 gm. of the protamine sulphate was hydrolysed with sulphuric acid, the hydrolysate, which was of only light yellow colour without any brown or dark tone, was diluted and the total nitrogen determined. The main part of the sulphuric acid in the remaining fluid was removed with baryta and filtered off. Making the filtrate slightly alkaline with lime suspension, the amide nitrogen liberated in this way as ammonia was estimated as usual; the residue in the distilling flask was filtered and washed, the filtrate together with the washings condensed in vacuo, covered with alcohol and well shaken, left for a night, filtered and washed, and the nitrogen in the precipitate determined. The filtrate together with the alcoholic washings was freed from alcohol by

evaporation in vacuo, slightly acidified with sulphuric acid, and the arginine contained in it precipitated by the silver-baryta process, filtered, washed thoroughly and the nitrogen of the precipitate estimated. The baryta and silver in filtrate and washings were removed with sulphuric acid and hydrogen sulphide. On adding sulphuric acid and phosphotungstic acid to the filtrate, a small quantity of flocculent precipitate was obtained; then followed filtering and washing. Solution of the free bases contained in the residue was effected according to A. Kossel and R. E. Gross (1924), and from it 0.1441 gm. of dinitronaphtholsulphonate (or flavianate) obtained.

0.1324 gm. substance gave 19.6 cc. N_2 at $20^\circ C$ and 763 mm Hg,	
calculated as $C_6H_{14}O_2N_4 \cdot C_{10}H_6N_2SO_8$	17.22%
found	16.92%.

The filtrate of the flavianate, freed from flavianic acid, showed no fresh precipitation at the addition of phosphotungstic acid.

The filtrate of the phosphotungstate was freed from phosphotungstic acid with baryta, and from the baryta in excess with sulphuric acid, then it was distilled in vacuo till almost all the water was evaporated, after which the distillation flask was connected with another flask containing concentrated sulphuric acid, and the air exhausted from the entire arrangement. In this condition it was left for two nights, then boiled for an hour with absolute alcohol, using a reflux condenser, and filtered, and the total and the amino nitrogen of the filtrate determined. The residue was brought back into the original flask, dried and boiled with methyl-alcohol as before, filtered, and the total nitrogen of the filtrate and the residue estimated. The results of these determinations were as follows:

	<i>gm.</i>	<i>per cent</i>
Total N	1.31694	100.00
Amide N	0.05276	4.01
N precipitated as Ca salt with alcohol	0.00808	0.61
Arginine N (as Ag salt)	1.03563	78.64
" " (calculated from flavianate)	0.01654	1.26
(Arginine N in total 1.05217 gm=79.90%)		
N soluble in ethylalcohol	0.06693	5.08
(therein non-amino N 0.03743 gm=2.84%)		
N soluble in methylalcohol	0.05958	4.52
N of the filtrate	0.02132	1.62
Total N refound	1.26084	95.74

From the foregoing colour reactions and determinations it appears that the protamine of the Formosan "bora" contains no tyrosine, phenylalanine, tryptophan, and no histidine, lysine and cystine, but that a relatively large amount of nitrogen is contained in the amino acids soluble in ethyl- and methylalcohol.

V. SUMMARY.

1. A protamine was isolated from the sperm of *Mugil japonicus* Temminck and Schlegel, of which the chloroplatinate showed the elementary constitution of $C_{36}H_{76}N_{15}O_{10} \cdot 4HCl + 2PtCl_4$ as empirical formula.

2. It contains probably no aromatic amino-acids, nor any basic amino-acids except a great quantity of arginine (70.58 per cent of the free protein); of mono-amino acids soluble in ethyl- and methylalcohol a relatively large amount is present.

3. As it seems to differ from the "MUGILINE" isolated by Prof. M. Yamakawa from *Mugil. "cephalus"*, I will call it "MUGILINE β " provisionally.

REFERENCES.

- Goto, M. (1902): Z. physiol. Chem. **37**, 97.
Kossel, A. (1896, 1898): *ibid.* **22**, 178; **25**, 166.
Kossel, A. u. Gross, R. E. (1924): *ibid.* **135**, 167.
Nelson-Gerhardt, M. (1919): *ibid.* **105**, 265.
Oshima, M. (1921): J. Zool. Soc. **389**, 71 (in Japanese).
Yamakawa, M. (1926): J. Imp. Fish. Inst. **22**, 162 (in Japanese with English résumé).

ÜBER DAS WESEN DER SALZHYDROLYSE DER STÄRKE BETRACHTET IM LICHT E DER SALZWIRKUNG AUF DIE BAKTERIEN- ENTWICKLUNG.

VON

MORIO YASUDA.

*(Aus der Biochemischen Institut der Kaiserlichen Universität zu Tokyo.
Vorstand: Prof. Dr. S. Kakiuchi.)*

(Eingegangen am 18. November 1928.)

Seitdem Kirchhoff (1811) die Spaltung der Stärke durch Kochen mit Säuren und durch die Wirkung der diastatischen Fermente entdeckte, sind zahlreiche Untersuchungen daran interessiert, einerseits die Struktur, andererseits den Spaltungsvorgang der Stärke und die dabei entstehenden Zwischenprodukte zu studieren. Dabei ist die Frage nach der Salzhydrolyse der Stärke, die seit einigen Jahren von verschiedenen Forschern diskutiert worden ist, ebenfalls, ganz bemerkenswert. Unter der Salzhydrolyse der Stärke verstand Biedermann (1916) die hydrolytische Spaltung der Stärke durch die Gegenwart der Salze in der Lösung, wie sie durch amylolytische Fermente bewerkstelligt wird. Er bemerkte zuerst, dass gelöste Stärke instand ist, an sich selbst eine Diastase neu zu bilden, wodurch die Stärke vollkommen zerlegt wird. Wohlgemuth (1919) und Rothlin (1922) kamen dagegen zu ganz negativen Resultaten; der letztere sagte, dass die Autolyse der Stärke von Biedermann weder durch Neubildung der Enzyme noch durch Aktivierung der Zymogenreste, sondern durch Einwirkung von Bakterien oder Pilzen erzielt würde. Der weitere Versuch Biedermanns hat dennoch diesen Widerspruch von Rothlin einem Versuchsfehler zugeschrieben und darauf aufmerksam gemacht, dass es dabei eine unentbehrliche Bedingung ist, dass dem zu prüfenden Gemisch der Stärke- und Salzlösung Luft zugeführt werde, und schloss, dass die Autolyse

nicht anders ist, als eine durch die Ionen gewisser Salze im Verein mit Sauerstoff direkt bewirkte langsame Hydrolyse.

Diese Behauptung wurde danach durch andere Autoren unterstützt, und zwar von Haehn (1923) und Iljin (1924). Haehn bestätigte also den Abbau der Stärke durch ein System der Neutralsalze, Aminosäuren und Pepton, obgleich durch Neutralsalze allein der Abbau niemals stattfände, wobei sich jedoch Iljin etwas anders aussprach, indem er berichtete, dass die Spaltung der Stärke durch anorganische Salze allein geschehe, wenn beide nach stärkerer Verdünnung gemischt würden. Dazu schienen die weiteren Versuche Biedermanns (1923) die Erscheinung der Salzhydrolyse der Stärke noch mehr hervorzuheben; da wurde ich, der ich damals—Sommer 1924—als Student in diesem Laboratorium mit einem biochemischen Kursus beschäftigt war, von Prof. Kakiuchi, der auf Grund vorsichtiger steriler Behandlung schon zu der Überzeugung gekommen war, dass das Wesen der Salzhydrolyse der Stärke schliesslich auf einer Mitwirkung der Microorganismen beruhen müsste, aufgefordert wurde, noch weitere Studie zu machen und besonders den Einfluss der Salze auf die Microorganismen, die in diesem Falle eine wesentliche Rolle spielen, zu untersuchen. Neuerdings, als meine Untersuchung schon fertig war, wurde auch von Takane (1926) mitgeteilt, dass auf Grund seiner ausführlichen Nachprüfungen der Versuche von Biedermann, Haehn und Iljin, die sogenannte Salzhydrolyse der Stärke dadurch zu erklären sei, dass die Substrate durch Bakterien verunreinigt waren.

Der Zweck der vorliegenden Abhandlung ist in erster Linie, für die Salzhydrolyse der Stärke einen wesentliche Beweis, wenn möglich, zu geben; zweitens aber ist danach gestrebt worden, den Einfluss der Salze auf die dabei sich geltend machenden Bakterien zu erforschen.

1. DIE ANSCHEINENDE STÄRKEABSPALTUNG DURCH SALZ.

Da es allgemein bekannt ist, dass die Microorganismen zu

ihrer Entwicklung einige Salze benötigen, ist am Anfang dieses Experimentes wohl zu beachten, dass Mikroorganismen in der mit Salzen gemischten Stärkelösung leicht gedeihen und unter Umständen auf den Stärkeabbau einen nicht geringen Einfluss ausüben können. Es scheint also von Bedeutung zu sein, dass man in diesem Falle ganz steril vorgehe und die Einwirkung von Mikroorganismen, die der Stärke oder den Salzen saprophytisch anhaften oder in der Luft als sogenannte Luftkeime sich befinden, auszuschliessen. Nach Haehn und Biedermann wird die günstigste Bedingung der Salzhydrolyse der Stärke dadurch herbeigeführt, dass man der Stärkelösung mit Salzgemisch, welches aus NaCl , KCl und CaCl_2 besteht, einige Aminosäuren und Pepton zusetzt. So haben wir in eine Reihe von Reagenzgläsern mit ca. 30 ccm Inhalt Stärkelösung, Salzgemisch und Pepton unter verschiedenen Mengenverhältnissen gegossen, und zwar wurden in die vorläufig sterilisierten Reagenzgläser sterilisierte Stärkelösung, äquimolekulares Salzgemisch und Pepton mittels einer sterilen Pipette gebracht und zuletzt mit sterilem Wasser das gesamte Volum des Lösungsgemisches auf 10 ccm verdünnt, sofort verwattet und im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Nach bestimmter Zeit wurde ein Teil des Lösungsgemisches in Reagenzgläsern entnommen, und der Grad des Stärkeabbaus durch Jodstärkereaktion geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle I gezeigt.

Aus der Tabelle ersieht man, dass der Stärkeabbau durch Salze, Pepton oder Salze und Pepton keinesfalls stattfindet, wenn man die Sterilisation berücksichtigt. Die Resultate, die wir nach Iljin und Biedermann verfahren, ohne die Sterilisation in Betracht zu ziehen, bekamen, waren aber etwas anders, wie wir in Tabelle II zeigen wollen.

Aus diesen Tabellen geht hervor, dass die Stärke, wenn man die Sterilisation nicht beachtet, durch Kochsalz, Salzgemisch, besonders durch Salzgemisch und Pepton zuweilen abgespaltet wird, und zwar derart, dass durch Kochsalz allein sehr schwer, durch Salzgemisch aber besser und durch Salzgemisch und Pepton

TABELLE I.

Einfluss der Salze auf den Stärkeabbau unter sterilem Verfahren.

Stärke: Kahlbaum lösliche Stärke

Salze: Kahlbaum „zur Analyse“.

Versuchstag: Juli 15-25, 1924.

Anfangskonzentration d.			Farbenreaktion auf Jod nach				
Stärke %	Salzge- misch mol.	Pepton %	1 Tag	3 Tagen	5 Tagen	7 Tagen	10 Tagen
0.01	0.001	0.01	blau	blau	blau		
„	2	2	„	„	„		
„	3	3	„	„	„		
„	4	4	„	„	„		
„	5	5	„	„	„		
„	7	7	„	„	„		
„	9	9	„	„	„		
„	0.01	0.1	„	„	„		
0.02	0.0	0.0	blau	blau	blau	blau	blau
„	0.1	0.0	„	„	„	„	„
„	0.0	0.05	„	„	„	„	„
„	0.1	0.05	„	„	„	„	„
„	0.05	0.05	„	„	„	„	„
„	0.01	0.05	„	„	„	„	„
0.02	0.002	0.02	blau	blau	blau	blau	blau
„	4	4	„	„	„	„	„
„	6	6	„	„	„	„	„
„	8	8	„	„	„	„	„
„	0.01	0.10	„	„	„	„	„

viel besser abgebaut wird. Dabei kann man nicht übersehen, dass der Stärkeabbau unregelmässig hier und da zustande kommt, was immer mehr an Einwirkung von Mikroorganismen denken lässt. So haben wir versuchsweise die Bakterien in den betreffenden Stärke-Salzlösungen in Reagenzgläsern nach folgender Methode gezählt, deren einige, nach der Farbenreaktion auf Jod beurteilt,

TABELLE II.

Einfluss der Salze auf den Stärkeabbau ohne Sterilisierungsverfahren.
 Arten der Salze: NaCl, CaCl₂ KCl und deren äquimolekulare Gemisch.
 Versuchstage: Juli 27–Aug. 1, 1924.

i) Einfluss des NaCl und CaCl₂ allein.

Anfangskonzentration d.		Farbenreaktion auf Jod (bei 37°C) nach		
Stärke	NaCl	20 Stdn.	40 Stdn.	80 Stdn.
0.1 %	0.5 N.	blau	blau	blau
"	0.1	"	"	"
"	0.05	"	"	"
"	0.01	violet	violet	rot
"	0.005	blau	blau	blau
"	0.001	"	"	"
"	0.0005	"	"	"
0.05	0.5	blau	blau	blau
"	0.1	"	"	"
"	0.05	"	"	"
"	0.01	"	"	"
"	0.005	"	"	"
"	0.001	"	"	"
"	0.0005	"	"	"
0.03	0.5	blau	violet	rot
"	0.1	"	blau	blau
"	0.05	"	"	"
"	0.01	"	violet	violet
"	0.005	"	blau	blau
"	0.001	"	"	"
"	0.0005	"	"	"
0.02	0.5	violet	violet	rot
"	0.1	blau	blau	blau
"	0.05	"	"	"
"	0.01	"	"	"
"	0.005	"	"	"
"	0.001	"	"	"
"	0.0005	"	"	"
0.01	0.5	violet	violet	
"	0.1	"	"	
"	0.05	blau	blau	
"	0.01	"	"	
"	0.005	"	"	
"	0.001	"	"	
"	0.0005	"	"	
0.02	CaCl ₂			
"	0.1 n	blau	blau	blau
"	0.05	"	"	"
"	0.01	"	"	"
"	0.005	"	violet	rot
"	0.001	"	blau	violet
"	0.0005	"	"	blau

ii) Einfluss des Salzgemisches: Gemisch gleicher Volumina der
m: 10 NaCl, KCl- und CaCl_2 -Lösung.

Anfangskonzentration d.		Farbenreaktion auf Jod (bei 37°C) nach			
Stärke %	Salzge- misch mol.	20 Stdn.	60 Stdn.	80 Stdn.	120 Stdn.
0.02	0.01	blau	gelb	gelb	gelb
"	0.009	"	violet	orange	gelb
"	0.008	"	"	"	"
"	0.007	"	"	"	"
"	0.006	"	blau	blau	violet
"	0.005	"	violet	orange	orange
"	0.004	"	"	"	"
"	0.003	"	"	"	"
"	0.002	"	blau	blau	violet
"	0.001	"	"	"	"

iii) Einfluss d. Salzgemisch + Pepton.

Anfangskonzentration d.			Farbenreaktion auf Jod (bei 37°C) nach		
Stärke %	Salzge- misch mol.	Pepton %	nach 40 Stdn.	80 Stdn.	100 Stdn.
0.02	0.01	0.1	violet	rot	gelb
"	0.009	0.09	"	"	"
"	8	8	"	"	"
"	7	7	"	"	"
"	6	6	blau	blau	violet
"	5	5	violet	gelb	gelb
"	4	4	blau	blau	blau
"	3	3	"	"	gelb
"	2	2	rot	gelb	rot
"	0.001	0.01	blau	violet	"

vollständigen Stärkeabbau, andere aber geringe oder ganz negative Spaltung zeigten.

Methode: Aus dem Stärke-Salzlösung enthaltenden Reagenz-

glas wird 1 ccm der Lösung mittels steriler Pipette in das sterile Reagenzglas entnommen und mit 9.0 ccm sterilem Wasser verdünnt. Durch Wiederholung desselben Verfahrens wird der Inhalt des ersten Reagenzglases auf das 1,000 fache verdünnt, davon werden 0.1 ccm in eine Petrischale gegossen, die mit Bouillonagar-Nährboden versehen ist; der Inhalt schmilzt zunächst durch Erhitzung, kühlt sich auf ca. 40°C ab und bleibt noch flüssig. Nach 24 stündiger Kultivierung im Brutschrank werden die Bakterienkolonien in der Schale gezählt.

Wir zählten die Bakterien in dem Stärkesalzgemisch in den verschiedenen Reagenzgläsern und fanden, dass die Zahl der Bakterien in einem Reagenzglas, dessen Inhalt auf Jod gelb reagierte, immer sehr hoch, ganz unbestimmbar war, und in dem durch Jod blau gefärbten nur gering war. Tabelle IV zeigt einige Beispiele.

TABELLE III.

Spaltungsgrad der Stärke und Bakterien-Zahl.

Versuchstag: Aug. 5, 1924.

Stärke %	Anfangskonzentration d.		Farben- reaktion auf Jod nach 40 Stdn.	Zahl der Bakterien- kolonien (rund)
	Salzgemisch mol.	Pepton %		
0.02	1.0	0	blau	200
„	0.1	0	orange	unzählbar
„	0.01	0	gelb	„
„	0.002	0.2	orange	„
„	0.004	0.4	blau	220
„	0.005	0.5	violet	340
„	0	0	blau	40
„	0.005	0.5	gelb	unzählbar
„	0	0	blau	60

So scheint der Spaltungsgrad der Stärke der Bakterienzahl proportional zu sein. Wir haben schon bestätigt, dass die Stärke durch Salze keinesfalls abgespalten wird, wenn alles steril behandelt

ist. Sie wird jedoch, wie mehrere Autoren behaupten, durch Salze hydrolysiert, wenn die Einwirkung von Bakterien nicht ausgeschlossen ist. Nun wurde gefunden, dass der Spaltungsvorgang proportional der Bakterienzahl resp. der Bakterienentwicklung stattfindet. Es liegt daher sehr nahe, daran zu denken, dass die Einwirkung der Bakterien als wesentliche Ursache des anscheinenden Stärkeabbaues durch Salze gegolten hat. Aber welche Arten von Bakterien sind denn wirksam, und welche Rolle spielen die Salze dabei? Das müssen wir selbstverständlich zunächst betrachten.

Aus den Reagenzgläsern, in denen die Stärke in hohem Grade abgespaltet war, isolierten wir mehrere verschiedene Bakterienarten und impften sie dem schiefen Nährboden des Bouillonagars ein, um eine Reinkultur der betreffenden Bakterien zu bekommen und dann die Wirksamkeit auf Stärkeabbau zu untersuchen. Glücklicherweise fanden wir dadurch einen der Bakterienstämme, die die Stärke hydrolytisch abspalten. Dies war mit gewöhnlichen Farbstoffen leicht färbbarer stäbchenartiger Kokkus. So haben wir Untersuchungen über die Beziehungen zwischen diesen Bakterien und den Salzen angestellt, deren Resultate ich im folgenden berichten will. Ich möchte hier bemerken, dass Glimm und Grimm (1928) in der neulich angekommenen Biochemischen Zeitschrift über die Salzhydrolyse der Stärke berichteten, dass sie auch eine Art stärkeabbauender Mikroorganismen isolieren konnten.

II. EINFLUSS DER SALZE AUF DIE STÄRKEABBAUENDEN BAKTERIEN.

Es wurde schon oben ermittelt, dass der Stärkeabbau in der Stärke-Salzlösung durch Entwicklung von Bakterien bedingt wird. Wir beabsichtigen daher, durch Beobachtung der Stärkeabspaltung die Entwicklung der Bakterien festzustellen und den Einfluss der Salze auf die Bakterien klarzumachen.

Methode: In eine Reihe der Reagenzgläser werden die Stärke-

und Salzlösungen gegossen, dann mit einer bestimmten Menge von Bakterien die den Stärkeabbau zu erzeugen vermögen, versetzt, und im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Die Bakterien werden dabei als Emulsion — 2 Ösen der 24 stündigen Reinkultur auf schiebem Bouillonagar in 1 ccm Wasser aufgeschwemmt — mittels Pipette zugefügt. Nach bestimmter Zeit wird der Abbau der Stärke durch Farbenreaktion auf Jod beobachtet.

Zuerst haben wir von NaCl, KCl Versuche angestellt. Die Resultate sind in Tabelle IV angegeben.

TABELLE IV.
Einfluss des NaCl und KCl auf die Bakterien.
Versuchstage: Aug. 26–30, 1924.

Anfangskonz. d.		Zugesetzte Bakterien- Emulsion ccm.	Farbenreaktion auf Jod nach		
Stärke %	NaCl %		24 Stdn.	48 stdn.	72 Stdn.
0.02	1.0	1.0	blau	blau	violet
„	0.5	„	„	„	rot
„	0.1	„	violet	rot	gelb
„	0.05	„	„	„	orange
„	0.01	„	blau	violet	rot
„	0.005	„	„	blau	violet
„	0.001	„	„	„	blau
0.02	0.001	1.0	blau	violet	
„	0.01	„	„	„	
„	0.1	„	violet	rot	
„	0.5	„	blau	violet	
„	1.0	„	„	blau	
0.02	KCl 0.8 n	1.0		blau violet	
„	0.5	„		rot	
„	0.1	„		„	
„	0.05	„		violet	
„	0.01	„		blau	
„	0.001	„		„	
„	0	„		„	

Auf Grund dieser Tabelle können wir sagen, dass das Salz zum Stärkeabbau genötigt ist und der Abbau resp. die Bakterienentwicklung regelmässig von der betreffenden Salzkonzentration abhängig ist. Die optimale Konzentration des Salzes liegt also zwischen 0.1 und 0.5 normaler Lösung, die gerade nahe der Konzentration der physiologischen Kochsalzlösung liegt.

Vor diesen Versuchen haben wir gesehen, dass die ganz gleich eingestellten Reagenzgläser zuweilen nicht übereinstimmende Abspaltung zeigen, was wir anfänglich nicht begreifen konnten. Bald haben wir jedoch diese Tatsache dem Umstande zugeschrieben, dass die Grösse der Oberflächen der Stärke-Salz-Bakterienmischung in den Reagenzgläsern, die im Becherglas an die Wand gelehnt und im Brutschrank aufbewahrt waren, verschieden war. Der Grund dieser Erscheinung bestand in folgendem: man veränderte die Oberflächengrösse der Mischung in den Reagenzgläsern auf verschiedene Weise, indem man die eine der drei Versuchsreihen auf 15°, der andere auf 45° und die dritte auf 90° neigte.

TABELLE V.
Einfluss der Oberflächengrösse auf die Bakterien.

Nr. der Reihe	Anfangskonz. d		Zugesetzte Bakterienemulsion ccm.	Neigung	Farbenreak. auf Jod nach 48 Stdn.
	Stärke %	NaCl n			
1	0.02	0.1	1.0	15°	orange
	„	„	„		gelb
	„	„	„		orange
11	0.02	0.1	1.0	45°	orange rot
	„	„	„		„
	„	„	„		„
111	0.02	0.1	1.0	90°	blau violett
	„	„	„		violett
	„	„	„		„

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Entwicklung der

Bakterien durch Vergrößerung der Oberfläche des Mediums begünstigt wird, was man wohl folgenderweise erklären muss: die grosse Oberfläche des Mediums lässt den Sauerstoff, den die betreffenden Bakterien zu ihrem Gedeihen benötigen, in die Lösung leicht diffundieren.

Mit Rücksicht auf die bisher erwähnten Bemerkungen haben wir sodann den Einfluss der verschiedenen Ionen auf die Bakterien untersucht. Die Resultate sind in Tabelle VI zusammengefasst.

TABELLE VI.

Einfluss der Anionen und Kationen auf die Bakterienentwicklung.

Versuchstage: Aug. 30-Sept. 5, 1924.

Anfangskonz. der Stärke ‰	Arten der Salze; alle Konz. 0,1 mol.	Zugesetzte Bakterien- emulsion ccm.	Farbenreaktion auf Jod nach		Anfangskonz. der Stärke ‰	Arten der Salze; alle Konz. 0,1 mol.	Zugesetzte Bakterien- emulsion ccm.	Farbenreaktion auf Jod nach	
			24 Stdn.	48 Stdn.				24 Stdn.	72 Stdn.
			bei 37°C						
0,02	NaCl	1,0	rot	orange	0,02	NaCl	1,0	rot	gelb
„	NaBr	„	violet rot	rot	„	KCl	„	blau violet	rot
„	NaJ	„	orange	gelb	„	NH ₄ Cl	„	blau	blau violet
„	NaNO ₃	„	orange rot	„	„	LiCl	„	blau violet	violet
„	Na ₂ SO ₄	„	gelb	„	„	RbCl	„	blau	blau
„	Na ₂ HPO ₄	„	violet	violet rot	„	CaCl ₂	„	„	rot
„	Na-citrat	„	„	orange	„	MgCl ₂	„	„	violet
„	Na-acetat	„	blau	blau	„	AlCl ₃	„	„	blau violet

Aus dieser Tabelle ersieht man, dass der Einfluss der Kationen sehr gering ist. Aber die Versuche, die betr. die Einwirkung der hochwertigen Kationen wie La, Ce, Th, Ti u.a. auf die Bakterienentwicklung, die den Stärkeabbau zur Folge hat, angestellt wurden, zeigten merkwürdige Ergebnisse, wie in Tabelle VII zusammengestellt ist.

TABELLE VII.

Einwirkung der hochwertigen Kationen auf die Bakterienentwicklung.
Versuchstage: Juli 12–15, 1926.

Anfangskonz. d.		Zugesetzte Bakteriemulsion ccm.	Salze der zuge- setzten hochwertigen Kationen		Farbenreaktion auf Jod nach		
Stärke %	NaCl n.		Art	Konz. n.	24 Stdn.	48 Stdn.	72 Stdn.
0.02	0.1	1.0	Kontrollversuch		blau	blau- violet	rot
"	"	"	(mit H ₂ O)		"	"	"
"	"	"			"	violet	"
0.02	0.1	1.0	LaCl ₃	0.001	blau	blau	blau
"	"	"	"	0.0001	"	blau- violet	violet
"	"	"	"	*0.00001	violet	rot	orange
"	"	"	"	0.000005	"	violet- rot	rot
0.02	0.1	1.0	Th(NO ₃) ₄	0.0001	blau	blau	blau
"	"	"	"	0.00001	"	violet	rot
"	"	"	"	"	"	"	"
"	"	"	"	*0.000005	violet	rot	gelb
"	"	"	"	* "	"	rot- orange	"
"	"	"	"	0.000001	blau	violet	rot
0.02	0.1	1.0	Ce(NO ₃) ₃	0.0001	blau	blau	blau
"	"	"	"	0.00005	"	violet- blau	violet
"	"	"	"	*0.00001	violet	violet	gelb
"	"	"	"	0.000005	blau	rot	rot
"	"	"	"	0.000001	"	"	"
0.02	0.1	1.0	TiCl ₄	0.0001	blau	blau	blau
"	"	"	"	*0.00001	"	violet	rot
"	"	"	"	*0.000005	"	rot	orange- rot
"	"	"	"	* "	"	"	"
"	"	"	"	0.000001	"	blau violet	violet

* Bezeichnet die beschleunigte Stärkeabspaltung.

Dabei wurde auch die Beziehung zwischen Stärkeabbau und Bakterienzahl studiert, wie Tabelle VIII zeigt.

TABELLE VIII.
Stärkeabbau und Bakterienzahl.

Anfangskonzentration d.			Zugesetzte Bakterien- emulsion cem.	Farbenreaktion auf Jod nach		Zahl der Bakterien Kolonien (rund) nach	
Stärke %	NaCl n.	LaCl ₃ n.		48 Stdn.	72 Stdn.	48 Stdn.	72 Stdn.
				bei 37°C			
0.02	0.1	0	1.0	blau- violet	violet	205	1560
”	”	0	”	”	”		
”	”	0.0001	”	blau	blau	40	60
”	”	”	”	”	”		
”	”	0.00001	”	blau- violet	rot	240	unzählbar
”	”	”	”	violet	”		

Aus diesen zwei Tabellen ersehen wir, dass die Salze der hochwertigsten Kationen im äusserst verdünnten Zustand die Bakterienentwicklung aktivieren, obgleich diese in höheren Konzentrationen vielmehr auf die Organismen giftig einzuwirken scheinen. Diese Tatsache wollen wir derart deuten, dass die Salze der hochwertigsten Kationen in hoher Verdünnung, nachdem die Giftigkeit verloren gegangen ist, durch Sauerstoffübertragung die Bakterienentwicklung begünstigen. Über die Wirkung als Sauerstoffüberträger von diesen Salzen ist schon von Killing, Jorissen und Reichert (1899) berichtet, doch wollen wir es auch bestätigen, indem wir die Einwirkung der betreffenden Salze auf die Oxydation des Eisensulfates als Modell studieren.

III. KATALYTISCHE WIRKUNG HOCHWERTIGER KATIONEN AUF DIE OXYDATION DES EISENSULFATES.

Methode: 1 cem von n/10 FeSO₄-Lösung wird in ziemlich

grossem Reagenzglas (ca. 15×25 cm.) entnommen, mit der Salzlösung der zu prüfenden Kationen und Wasser zugesetzt, bis das gesamte Volum des Lösungsgemisches 10 ccm beträgt, mit Gummikropf verschlossen und wie vorher im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Nach bestimmter Zeit wird das zurückbleibende, nicht oxydierte FeSO_4 mit $n/100$ KMnO_4 titriert.

Die FeSO_4 -Lösung hat die Neigung, wenn sie in der Luft blossgelegt wird, langsam zum $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ oxydiert zu werden. Die Oxydation ist aber von der Wasserstoffionenkonzentration sehr abhängig, so haben wir zuerst die Wasserstoffionenkonzentration untersucht. Dabei wurden als Puffer nach Sörensen hergestellte HCl , Glykokoll; Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 ; und NaOH , Glykokoll Misch-

TABELLE IX.

Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Oxydation des FeSO_4 .
Anfangsmenge des FeSO_4 : 1 ccm $n/10$ $\text{FeSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ (= 2.95 mg. Fe)
Versuchstage: Sept. 5–8, 1926.

pH	Zurückbleibendes FeSO_4 nach 3 Stdn. bei 37°C		Proz. der Oxydierung
	Titrationzahl mit $n:100$ KMnO_4 in ccm.	als Fe berechnet in mg.	
3.7	5.30	2.93	0
5.3	3.90	2.18	26.4
6.2	3.80	2.12	28.4
7.2	3.60	2.01	32.0
8.0	3.50	1.96	33.7
9.1	2.90	1.62	45.2
9.6	2.50	1.40	52.6
9.9	2.30	1.29	56.4
11.0	2.95	1.56	47.2
11.9	3.20	1.79	39.5

ungen gebraucht, und die Wasserstoffionenkonzentration nach der Indikatorenmethode von Clark und Lubs bestimmt.

Die Oxydation des FeSO_4 scheint in alkalischer Reaktion sehr beschleunigt zu sein und das Optimum zwischen pH 9.6 und 9.9 zu liegen.

Dann wurden die Versuche über die katalytische Wirkung der hochwertigen Kationen angestellt; die Ergebnisse sind in folgender Tabelle niedergelegt.

TABELLE X.

Einwirkung der hochwertigen Kationen auf die Oxydation des FeSO_4 .
Anfangsmenge des FeSO_4 : 5 cem n/20 $\text{FeSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ (= 7.36 mg. Fe)
Versuchstage: Sept. 10–15, 1926.

pH	Arten d. Salze (Konz. = n/1000)	Zurückbleibendes FeSO_4 nach 3 Stdn. bei 37°C		Proz. der Oxydierung
		Titrationzahl mit n/100 KMnO_4 in cem.	als Fe berechnet in mg.	
8.6	$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$	6.00	3.35	54.5
„	$\text{Zr}(\text{NO}_3)_4$	6.80	3.80	48.4
„	TiCl_4	7.60	4.24	42.4
„	$\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$	7.10	3.97	46.1
„	$\text{Yt}(\text{NO}_3)_3$	6.95	3.88	47.3
„	LaCl_3	7.40	4.13	43.9
„	H_2O	8.50	4.75	35.5

Daraus ist also zu ersehen, dass die Oxydation des FeSO_4 durch Zusetzung mit den Salzen betreffender Kationen beschleunigt wird, was man auf die Wirkung als Sauerstoffüberträger zurückführen muss.

Auf den oben genannten Salzen wurde $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ gewählt, um den Einfluss auf die Oxydation des FeSO_4 unter verschiedenen Konzentrationen, besonders in äusserst verdünntem Zustande zu untersuchen.

TABELLE XI.

Wirkung des $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ auf die Oxydation des FeSO_4 unter verschiedenen Konzentrationen.

Versuchstage: Sept. 15-24, 1926.

FeSO_4	$\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ Konz.	pH	Zurückbleibendes FeSO_4 nach 3 Stdn. bei 37°C		Proz. der Oxydierung
			Titrationzahl mit n/100 KMnO_4 in cem.	als Fe berechnet in mg.	
Anfangsmenge: 1 cem von n/10 FeSO_4 Anfangskonz.: n/100	n/25	9.0	4.00	2.23	69.7
	n/50	„	3.50	1.96	73.3
	n/100	„	4.30	2.40	67.3
	n/200	8.0	6.35	3.55	65.2
	n/400	8.6	6.70	3.74	49.1
	n/800	8.8	7.10	3.97	46.1
	n/1600	9.0	8.00	4.47	39.3
	n/3200	„	8.50	4.75	35.5
	n/ ∞	„	8.50	4.75	35.5

nach 40 Stdn. bei 37°C

Anfangsmenge: 5 cem von n/20 FeSO_4 Anfangskonz.: n/80	n/800	7.0	4.15	2.31	68.6
	n/6400	7.2	6.85	3.83	48.1
	n/12800	„	7.10	3.96	46.2
	n/ ∞	„	8.30	4.64	37.1

nach 60 Stdn. bei 37°C

5 cem. von n/20 FeSO_4 Anfangskonz.: n/80	n/25600	7.2	6.15	3.44	53.4
	n/51200	„	6.65	3.71	49.6
	n/ ∞	„	7.10	3.96	47.8
	n/ ∞	„	7.10	3.96	47.8

Die katalytische Wirkung des $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ ist in der Konzentration von $n/50$ am deutlichsten, und nimmt mit der Verdünnung ab, aber sie wird in der hohen Verdünnung, wenn man lange Zeit hindurch beobachtet, noch bemerkt.

Auf diese Weise glauben wir bestätigt zu haben, dass die hochwertigen Kationen durch Sauerstoffübertragung die Oxydation des FeSO_4 beschleunigen; dieselbe Eigenschaft dürfte sich vielleicht im Medium der Mikroorganismen entfalten und zur Begünstigung der Entwicklung beitragen.

ZUSAMMENFASSUNG.

Es wurden Versuche angestellt, zuerst über die hydrolytische Spaltung der Stärke durch neutrale Salze oder Pepton; und es wurde festgestellt, dass sie schliesslich durch Einwirkung der Mikroorganismen erzeugt wird. Dann wurde über den Einfluss der Salze auf die Bakterien, die stärkeabbauend wirken, nachdem sie isoliert und rein kultiviert waren. Dabei war merkwürdig, dass die Entwicklung der Bakterien in einem innigen Verhältnis mit der Konzentration der Salzlösung steht, und dass die hochwertigen Kationen in sehr hoher Verdünnung, in chemisch kaum nachweisbarer geringer Menge, auf die Bakterienentwicklung sehr aktiv einwirken. In der Natur dürften diese Kationen in verschiedenen Medien, wo verschiedene Mikroorganismen sich befinden, vorkommen und die Entwicklung der Mikroorganismen beeinflussen.

Drittens konnte man bestätigen, dass dieselben Kationen durch Sauerstoffübertragung auf die Mikroorganismen günstig wirken, was wir durch Untersuchung des Einflusses derselben Kationen auf die Oxydation des Eisensulfates konstatiert haben.

Diese Arbeit wurde unter der Leitung Herrn Prof. Dr. S. Kakiuchis ausgeführt und an der zweiten Generalversammlung der Japanischen Biochemischen Gesellschaft (zu Kyoto, Okt. 1926) von mir gelesen. Für die freundlichen Ratschläge des Leiters

bin ich ihm zum herzlichsten Dank verpflichtet. Ich muss auch gleichzeitig ihn wegen der Verspätung der schriftlichen Veröffentlichung der Arbeit um Entschuldigung bitten.

LITERATUREN.

- Biedermann, W. (1916): Fermentforschung, **1**, 474.
„ (1922): Biochem. Z., **129**, 582.
„ (1922): Münchner Med. Woch. Nr. 39, 1402.
„ (1923): Biochem. Z., **137**, 35.
Glimm, E. u. Grimm, R. (1928): Biochem. Z., **197**, 445.
Haehn, H. (1923): Biochem. Z., **139**, 587.
Iljin, W. S. (1924): Biochem. Z., **145**, 14.
Jorssen, W. P. u. Reichert, L. Th. (1899): Zeits. Physik. chem., **31**, 142.
Kirchhoff (1811): Journ. de Pharm., **74**, 199.
Rothlin, E. (1922): Fermentforschung, **5**, 236.
Takane, K. (1926): Biochem. Z., **175**, 241.
Wohlgemüth, J. (1919): Biochem. Z., **94**, 213.

ÜBER DIE WIRKUNG DER PROTEOLYTISCHEN FERMENTE AUF DIE BENZOYL- UND DESAMINO- DERIVATE DER POLYPEPTIDE.

VON

TSUTOMU KAWAI.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der kaiserlichen Universität
zu Kyoto. Director: Prof. Dr. K. Mayeda.)

(Eingegangen am 5. Dezember 1928.)

Im hiesigen Institut wurde bei den Untersuchungen der Wirkung des Darmerepsins auf die Polypeptidderivate, die ausschliesslich aus Glykokoll aufgebaut sind (Imai, 1924, i), nachgewiesen, dass solche Verbindungen, die bei der totalen Hydrolyse drei oder mehr Moleküle Glykokoll erzeugen, durch Erepsin gespalten werden, während solche, die unter den gleichen Bedingungen zwei Moleküle Glykokoll abspalten, durch Erepsin nicht hydrolysiert werden. Aber im Eiweissmolekül ist das Vorhandensein einer solchen langen Kette, die aus Glykokoll allein zusammengesetzt ist, nicht denkbar.

Daher ist es wünschenswert, die Untersuchung auf solche Polypeptidderivate, die aus verschiedenen Aminosäuren aufgebaut sind, auszudehnen.

Zu diesem Zwecke stellte ich Glycyl-dl-phenylalanin, dl-Leucylglycin, Glycyl-l-phenylalanin und Glycyl-l-leucin dar und untersuchte zuerst ihr Verhalten gegen Erepsin und Trypsin. Dabei stellte ich fest, dass alle diese Dipeptide durch Erepsin leicht gespalten werden, während sie durch Trypsin fast nicht angegriffen werden.

Zunächst untersuchte ich die Wirkung des Trypsins und Erepins auf die Benzoylderivate dieser Dipeptide. Wie Benzoylglycylglycin wurden sie durch gereinigtes Erepsin gar nicht gespalten. Mit einer nicht gereinigten Erepinslösung (Glycerinextrakt der Rindsdünndarmschleimhaut) wurden sie dagegen

deutlich hydrolysiert, während Benzoylglycylglycin dadurch gar nicht hydrolysierbar war. Spaltung der Benzoylderivate der Dipeptide, wie Glycyl-dl-phenylalanin, dl-Leucylglycin u.s.w., mit Glycerinextrakt der Rindsdünndarmschleimhaut durch Erepsin selbst oder durch beigemengtes Trypsin oder ein dem Trypsin nahe verwandtes Ferment hervorgerufen, ist vorläufig nicht sicher gestellt.

Durch Trypsin (Grübler) werden die Benzoylderivate von Glycyl-dl-phenylalanin, dl-Leucylglycin, Glycyl-l-phenylalanin und Glycyl-l-leucin gespalten, und zwar verläuft die Spaltung bei racemischen Verbindungen asymmetrisch. Beim Versuch mit Benzoylglycyl-dl-phenylalanin fand ich als tryptische Spaltungsprodukte Hippursäure und l-Phenylalanin. Dadurch ist mit Sicherheit erwiesen, dass die Spaltung der Benzoyldipeptide an der Stelle der Peptidbindung auftritt. Das Verhalten von Benzoylglycylglycin gegen Trypsin ist ganz verschieden von dem der Benzoylderivate der anderen untersuchten Dipeptide. Die Substanz ist weder durch Erepsin noch durch Trypsin (Grübler) hydrolysierbar. Dieses Resultat stimmt nicht ganz überein mit denen von Utzino (1928), der unabhängig vom Verfasser das Verhalten von Benzoyl- und Phtalylglycylglycin gegen Pankreasfermente untersuchte, wobei sich ergab, dass sowohl Benzoyl- als auch Phtalylglycylglycin durch Pankreassaft, Pankreaspresssaft, Pankreatin u.s.w., und zwar an der Stelle der Glycylglycinbindung, hydrolysiert werden. Ob die Spaltung von Benzoylglycylglycin, die Utzino (1928) beobachtete, durch Trypsin hervorgerufen wird oder durch ein dem Trypsin sehr nahe verwandtes Ferment, das im Grüblerschen Trypsinpräparat nicht vorhanden war, ist noch nicht aufgeklärt.

Ausser Trypsin (Grübler) sind die Benzoylderivate vor allem durch nach dem Adsorptionsverfahren gereinigtes Trypsin hydrolysierbar.

Aus all diesen Ergebnissen geht höchst wahrscheinlich hervor, dass die Benzoylderivate der Dipeptide durch Trypsin oder ein

dem Trypsin sehr nahe verwandtes Ferment an Stelle der Peptidbindung gespalten werden.

Da in der oben erwähnten Weise die durch Trypsin nicht hydrolysierbaren Dipeptide, wie Glycyl-dl-phenylalanin und dl-Leucylglycin, wenn ihre freie Aminogruppe durch Benzoylradikal bedeckt wird, durch Trypsin hydrolysierbar werden, so untersuchte ich weiter die Wirkung des Trypsins auf Tripeptide, bei welchen noch eine Aminosäure mit den durch Trypsin nicht hydrolysierbaren Dipeptiden gekuppelt ist, und stellte fest, dass Diglycyl-dl-phenylalanin und Dileucylglycin durch Trypsin hydrolysiert wurden. Diese Resultate stimmen mit denen von Emil Fischer und Emil Abderhalden (1905) überein, die festgestellt haben, dass Glycylleucylalanin und Alanylleucylglycin durch Trypsin hydrolysierbar sind, während Leucylalanin und Leucylglycin dadurch nicht gespalten werden.

Das Verhalten der Benzoylderivate der Tri- und Tetrapeptide, die ausser Glykokoll noch dl-Phenylalanin enthalten, gegen Erepsin ist ganz gleich wie bei den Benzoylderivaten der auf Glykokoll allein aufgebauten Polypeptide (Imai, 1924), es werden nämlich Benzoyldiglycyl-dl-phenylalanin und Benzoyltriglycyl-dl-phenylalanin durch Erepsin hydrolysiert.

Im Anschluss an diese Versuche untersuchte ich die Wirkung des Trypsins auf Benzoyldiglycylglycin, und es ergab sich, dass dieses durch Trypsin gar nicht abgebaut wird.

Über die Wirkung des Erepsins auf die desaminierten Polypeptide fand Murachi (1927), dass Glykolylglycin und Glykolylglycylglycin durch Erepsin nicht hydrolysierbar sind, während Glykolyldiglycylglycin dagegen dadurch hydrolysierbar ist. Nach diesen Resultaten verhalten sich die Glykolylderivate von Glycylglycin und Diglycylglycin gegen Erepsin in ganz gleicher Weise wie die Benzoylderivate. Daher dürfte es interessant sein zu untersuchen, wie sich die desaminierten Polypeptide gegen Trypsin verhalten.

Zu diesem Zwecke stellte ich Glykolyl-dl-phenylalanin, Glykolyl-

glycyl-dl-phenylalanin, Leukolylglycin und Leukoyl-leucylglycin dadurch dar, dass ich auf die entsprechenden Di- und Tripeptide Salzsäure und Silbernitrit einwirken liess. Leukolylglycin wurde ebenfalls durch die Einwirkung von frisch gefälltem Silberoxyd auf Bromisokapronylglycin dargestellt.

Alle erhaltenen Säuren krystallisieren nur schwer in reiner Form, und ihre Eigenschaften sind nicht genau anzugeben. Über ihr Verhalten gegen proteolytische Fermente konstatierte ich, dass alle untersuchten Säuren gegen Erepsin sehr widerstandsfähig sind, dagegen durch Trypsin Glykolylglycylphenylalanin und Leukoylleucylglycin hydrolysiert werden, während Glykolyl-dl-phenylalanin und Leukolylglycin dadurch nicht hydrolysierbar sind.

Diese Ergebnisse stimmen mit den bei den Versuchen mit Benzoylderivaten erhaltenen gut überein.

Eine Untersuchung über die Wirkung des Trypsins auf die anderen verschiedenen Derivate der Dipeptide ist im hiesigen Institut im Gang.

Experimenteller Teil.

I. WIRKUNG DES TRYPSINS AUF GLYCYL-DL-PHENYLALANIN, DL-LEUCYLGLYCIN, GLYCYL-L-PHENYLALANIN UND GLYCYL-L-LEUCIN.

Versuch 1.

0,25 g Glycyl-dl-phenylalanin (Leuchs u. Suzuki, 1904) wurden in der berechneten Menge Sodalösung gelöst, darauf 0,1 g Soda zugefügt, das Gemisch auf 50 ccm mit Wasser verdünnt und unter Zusatz von 0,5 g Trypsin (Grübler) und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

Zur Kontrolle wurden die sodaalkalische Trypsinlösung und die sodaalkalische Glycyl-dl-phenylalaninlösung mit gekochtem Trypsin bei 37°C. digeriert.

In allen Fällen wurde der freie Aminostickstoff nach van Slyke bestimmt.

TABELLE I.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Trypsinlösung in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Glycyl-dl-phenyl- alaninlösung mit gekochter Trypsinlösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,7532	0,0267	0,7544	
20	0,7542	0,0267	0,7546	0,0008
44	0,7660	0,0289	0,7542	0,0108
68	0,8066	0,0272	0,7544	0,0529

Versuch 2.

0,25 g dl-Leucylglycin (Fischer u. Brunner, 1907) wurden in 50 cem Sodalösung, die 0,38 g Sada enthielt, gelöst und unter Zusatz von 0,5 g Trypsin (Grübler) und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE II.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Trypsinlösung in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer dl-Leucylglycinlösung mit gekochter Trypsinlösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,8140	0,0268	0,8162	
20	0,8151	0,0268	0,8162	0,0011
44	0,8162	0,0284	0,8164	0,0006
68	0,8176	0,0284	0,8162	0,0020

Versuch 3.

0,25 g Glycyl-l-phenylalanin wurde in 50 cem Sodalösung, die

0,52 g Soda enthielt, gelöst und unter Zusatz von 0,5 g Trypsin (Grübler) und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE III.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Trypsinlösung in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Glycyl-l-phenylalanin- lösung mit gekochter Trypsinlösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,8129	0,0269	0,8142	
14	0,9008	0,0269	0,8142	0,0879
34	1,0120	0,0272	0,8142	0,1988
58	1,0088	0,0274	0,8142	0,1954

Versuch 4.

0,25 g Glycyl-l-leucin (Fischer u. Steingröver, 1909) wurden in 50 cem 0,29%-iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 0,5 g Trypsin (Grübler) und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE IV.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Trypsinlösung in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Glycyl-l-leucinlösung mit gekochter Trypsinlösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,8507	0,0269	0,8528	
18	0,8618	0,0262	0,8528	0,0118
32	0,8729	0,0272	0,8530	0,0219
66	0,8729	0,0274	0,8540	0,0205

Wie aus Tabelle I, II, III und IV ersichtlich ist, wurde Glycyl-l-phenylalanin durch Trypsin etwas hydrolysiert, die drei anderen Substanzen dagegen nicht.

II. WIRKUNG DES EREPSINS AUF GLYCYL-DL-PHENYLALANIN,
DL-LEUCYLGLYCIN, GLYCYL-L-PHENYLALANIN
UND GLYCYL-L-LEUCIN.

Die gebrauchte Erepsinlösung wurde dadurch hergestellt, dass der Glycerinextrakt der Rindsdarmschleimhaut nach dem Adsorptionsverfahren von Willstätter und Waldschmidt-Leitz (1923) gereinigt wurde. Die so bereitete Erepsinlösung übte keine tryptische Wirkung auf Edestin mehr aus, während die ereptische Wirkung auf Glycylglycin sich deutlich erkennen liess.

Versuch 1.

0,25 g Glycyl-dl-phenylalanin und 0,64 g Soda wurden in 45 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 5 ccm Erepsinlösung und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE V.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Erepsinlösung in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Glycyl-dl-phenyl- alaninlösung mit gekochter Erepsinlösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,7452	0,0112	0,7464	
20	0,9563	0,0112	0,7464	0,2111
44	1,0119	0,0236	0,7464	0,2543
68	1,0286	0,0334	0,7464	0,2612
92	1,0564	0,0334	0,7464	0,2890

Versuch. 2.

0,2 g dl-Leucylglycin und 0,38 g Soda wurden in 45 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 5 ccm Erepsinlösung und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE VI.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Erepsinlösung in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer dl-Leucylglycinlösung mit gekochter Erepsinlösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,8242	0,0122	0,8271	
20	1,3344	0,0122	0,8271	0,5102
44	1,3566	0,0334	0,8271	0,5112
68	1,3568	0,0343	0,8271	0,5105

Versuch 3.

0,25 g Glycyl-l-phenylalanin und 0,64 g Soda wurden in 45 cem Wasser gelöst und unter Zusatz von 5 cem Erepsinlösung und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE VII.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Erepsinlösung in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Glycyl-l-phenylalanin- lösung mit gekochter Erepsinlösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,8451	0,0122	0,8486	
20	1,0008	0,0122	0,8486	0,1557
44	1,1231	0,0226	0,8474	0,2676
68	1,1251	0,0334	0,8478	0,2588

Versuch 4.

0,25 g Glycyl-l-leucin und 0,38 g Soda wurden in 45 cem Wasser gelöst, darauf 5 cem Erepsinlösung und etwas Toluol zuzesetzt und bei 37°C. digeriert.

TABELLE VIII.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Erepsinlösung in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Glycyl-l-leucinlösung mit gekochter Erepsinlösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,8528	0,0122	0,8562	
20	0,9642	0,0124	0,8562	0,1112
44	1,1436	0,0346	0,8564	0,2682
68	1,1444	0,0342	0,8564	0,2696

Aus Tabelle V, VI, VII und VIII geht hervor, dass Glycyl-dl-phenylalanin, dl-Leucylglycin, Glycyl-l-phenylalanin und Glycyl-l-leucin durch Erepsin gespalten werden.

III. WIRKUNG DES EREPSINS AUF BENZOYLGLYCYL-DL-PHENYL- ALANIN, BENZOYL-DL-LEUCYLGLYCIN, BENZOYLGLYCYL-L- PHENYLALANIN UND BENZOYLGLYCYL-L-LEUCIN.

Versuch 1.

Benzoylglycyl-dl-phenylalanin (Curtius u. Müller, 1904) wurde in der üblichen Weise durch Benzoylierung von Glycyl-dl-phenylalanin dargestellt.

4,8 g Glycyl-dl-phenylalanin wurden mit 30 ccm n-Natronlauge übergossen, in Kältemischung stark abgekühlt, und unter starkem Schütteln wurden abwechselnd 4,5 g Benzoylchlorid (in Äther gelöst) und 45 ccm n-Natronlauge im Laufe einer Stunde hinzugefügt. Nach dem der Geruch der Benzoylchlorids verschwunden war, wurde das Gemisch mit Salzsäure angesäuert, nach einiger Zeit der entstandene weisse krystallinische Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus heissem Wasser umkrystallisiert. Schmelzpunkt 172°C. (unkorr.) Ausbeute 4,2 g Die Analyse der im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrockneten Substanz ergab einen mit Benzoylglycylphenylalanin übereinstimmenden Wert.

0,1463 g Substanz brauchten zur Neutralisation des
Ammoniaks 8,9 ccm N/10 H_2SO_4

Ber. für: $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO.NH.CH}_2\text{CO.NH.CH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5).\text{COOH}$ 8,59%N
Gef. 8,55%N

0,5 g Benzoylglycyl-dl-phenylalanin und 0,64 g Soda wurden
in 45 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 5 ccm gereinigter
Erepsinlösung und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE IX.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Erepsinlösung in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Benzoylglycyl-dl- phenylalaninlösung mit gekochter Erepsinlösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,0142	0,0142	0,142	
20	0,0142	0,0142	0,142	0
44	0,0342	0,0332	0,142	0,0010
68	0,0386	0,0334	0,142	0,0052

Versuch 2.

0,5 g Benzoyl-dl-leucylglycin (Fischer u. Brunner, 1905)
und 0,69 g Soda wurden in 45 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz
von 5 ccm gereinigter Erepsinlösung und etwas Toluol bei 37°C.
digeriert.

TABELLE X.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Erepsinlösung in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Benzoyl-dl-leucyl- glycinlösung mit gekochter Erepsinlösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,0124	0,0124	0,0124	
20	0,0124	0,0124	0,0124	0
44	0,0354	0,0334	0,0124	0,0020
68	0,0348	0,0342	0,0124	0,0006

Versuch 3.

Benzoylglycyl-l-phenylalanin wurde durch Benzoylierung des Glycyl-l-phenylalanins dargestellt. Die Ausbeute betrug 84% der theoretischen Menge. Die zweimal aus heissem Wasser umkrystallisierte Substanz krystallisierte in Nadeln, die bei 168°C. (unkorr.) schmolzen.

0,1884 g Substanz brauchten zur Neutralisation des
Ammoniaks 11,5 ccm n/10 H₂SO₄.

Ber. für: C₆H₅.CO.NH.CH₂.CO.NH.CH(C₆H₅).COOH 8,59% N
Gef. 8,56% N

0,5 g Benzoylglycyl-l-phenylalanin und 0,64 g Soda wurden in 45 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 5 ccm gereinigter Erepsinlösung und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XI.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Erepsinlösung in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Benzoyl-glycyl-l- phenylalaninlösung mit gekochter Erepsinlösung in mg	abgespul- tener N in mg
0	0,0128	0,0128	0,0128	
20	0,0240	0,0128	0,0128	0,0112
48	0,0321	0,0320	0,0128	0,0001
72	0,0324	0,0321	0,0128	0,0003

Versuch 4.

Benzoylglycyl-l-leucin wurde in der bekannten Weise durch Benzoylierung des Glycyl-l-leucins dargestellt. Die aus viel heissem Wasser umkrystallisierte Substanz zeigte keinen scharfen Schmelzpunkt.

0,2304 g Substanz brauchten zur Neutralisation des
Ammoniaks 15,0 ccm n/10 H₂SO₄.

Ber. für: $C_6H_5.CO.HN.CH_2.CO.NH.CH(C_4H_9).COOH$ 9,59% N
 Gef. 9,18% N

0,5 g Benzoylglycyl-l-leucin und 0,69 g Soda wurden in 45 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 5 ccm gereinigter Erepsinlösung und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XII.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Erepsinlösung in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Benzoylglycyl-l- leucinlösung mit gekochter Erepsinlösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,0126	0,0126	0,0126	
20	0,0128	0,0128	0,0126	0
44	0,0284	0,0126	0,0126	0,0158
68	0,0302	0,0276	0,0126	0,0026

Wie aus Tabelle IX, X, XI und XII ersichtlich ist, wurden Benzoylglycyl-dl-phenylalanin, Benzoyl-dl-leucylglycin, Benzoylglycyl-l-phenylalanin und Benzoylglycyl-l-leucin durch Erepsin gar nicht gespalten. Aus diesen Ergebnissen geht sicher hervor, dass die Benzoylderivate der Dipeptide, die nicht aus Glykoll allein zusammengesetzt sind, durch Erepsin nicht hydrolysiert werden.

IV. WIRKUNG DES DÜNNDARMEXTRAKTES AUF BENZOYLGLYCYL-DL-PHENYLALANIN UND BENZOYL-DL-LEUCYLGLYCIN.

Die gebrauchte Fermentlösung wurde in folgender Weise hergestellt.

Die ausgekratzte Schleimhaut des Rindsdünndarms wurde mit Sand gut zerrieben, mit der dreifachen Menge Glycerin gut durchgemischt und im Eisschrank aufbewahrt. Beim Gebrauch wurde die obere leicht getrübbte Schicht abpipetiert.

Versuch 1.

0,5 g Benzoylglycyl-dl-phenylalanin wurden in 45 cem Soda-lösung, die 0,64 g Soda enthielt, gelöst und unter Zusatz von 5 cem Dünndarmextrakt und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XIII.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Erepsinlösung in mg	abgespaltener Amino N in mg
0	0,1766	0,1776	
20	0,3192	0,1998	0,1204
44	0,3520	0,2226	0,1304
48	0,3728	0,2226	0,1512

Versuch 2.

0,5 g Benzoyl-dl-leucylglycin wurden in 45 cem Sodalösung, die 0,69 g Soda enthielt, gelöst und unter Zusatz von 5 cem Dünndarmschleimhautextrakt und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XIV.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Trypsinlösung in mg	abgespaltener Amino-N in mg
0	0,1776	0,1776	
20	0,3498	0,1998	0,1500
44	0,3782	0,2226	0,1556
48	0,3992	0,2226	0,1766

Versuch 3.

0,5 g Benzoylglycylglycin wurden in 45 cem Sodalösung, die

0,72 g Soda enthielt, gelöst und unter Zusatz von 5 cem Dünndarmschleimhautextrakt und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XV.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Erepsinlösung in mg	abgespaltener Amino-N in mg
0	0,1776	0,1776	
20	0,1998	0,1998	0
44	0,2226	0,2226	0
48	0,2226	0,2226	0

Wie aus Tabelle XIII, XIV und XV zu ersehen ist, werden Benzoylglycyl-dl-phenylalanin und Benzoyl-dl-leucylglycin durch Erepsinlösung hydrolysiert, während Benzoylglycylglycin gar nicht angegriffen wird.

V. WIRKUNG DES TRYPSINS AUF BENZOYLGLYCYL-DL-PHENYL-
ALANIN, BENZOYL-DL-LEUCYLGLYCIN, BENZOYLGLYCYL-
L-PHENYLALANIN, BENZOYLGLYCYL-L-LEUCIN
UND BENZOYLGLYCYLGLYCIN.

Versuch 1.

0,5 g Benzoylglycyl-dl-phenylalanin wurden in der berechneten Menge Sodalösung gelöst, darauf 0,1 g Soda zugefügt, das Gemisch mit Wasser auf 50 cem verdünnt und unter Zusatz von 0,5 g Trypsin (Grübler) und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

Bei der sofortigen polarimetrischen Untersuchung zeigte die Flüssigkeit im 2 dm. Rohr Linksdrehung von 0,19°. während die Kontrollprobe, bei denen 0,5 g Trypsin in 50 cem 0,1%-iger Soda-lösung gelöst worden war, im 2 dm. Rohr 0,19° nach links drehte.

TABELLE XVI.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Trypsinlösung in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Benzoyl-glycyl-dl- phenylalaninlösung mit gekochter Trypsinlösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,0272	0,0272	0,0298	
20	0,2080	0,0274	0,0298	0,1806
44	0,2321	0,0274	0,0298	0,2047
68	0,2326	0,0276	0,0302	0,2046

Nach 68 stündiger Digestion zeigte das Verdauungsgemisch im 2 dm. Rohr eine Linksdrehung von $0,58^\circ$, während die Drehung der Kontrollprobe unverändert blieb.

Versuch 2.

0,5 g Benzoyl-dl-leucylglycin und 0,69 g Soda wurden in 50 cem Wasser gelöst und unter Zusatz von 0,5 g Trypsin (Grübler) und etwas Toluol bei 37°C . digeriert. Bei der sofortigen Untersuchung zeigte die Flüssigkeit sowie die Kontrollprobe (0,5 g Trypsin in 50 cem Sodalösung gelöst) im 2 dm. Rohr eine Linksdrehung von $0,19^\circ$.

TABELLE XVII.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Trypsinlösung in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Benzoyl-dl-leucyl- glycinlösung mit gekochter Trypsinlösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,0276	0,0272	0,0298	
20	0,3480	0,0276	0,0302	0,3200
44	0,4176	0,0282	0,0304	0,3890
68	0,4888	0,0272	0,0302	0,4602

Nach 68stündiger Digestion drehte die Flüssigkeit im 2 dm. Rohr 0,02° nach links, während die Drehung der Kontrollprobe unverändert blieb.

Versuch 3.

0,5 g Benzoylglycyl-l-phenylalanin und 0,64 g Soda wurden in 50 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 0,5 g Trypsin (Grübler) und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XVIII.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Trypsinlösung in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Benzoylglycyl-l- phenylalaninlösung mit gekochter Trypsinlösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,0272	0,0272	0,0294	
20	0,1624	0,0272	0,0294	0,1352
44	0,1624	0,0274	0,0294	0,1350
68	0,1568	0,0280	0,0298	0,1288

Versuch 4.

0,5 g Benzoylglycyl-l-leucin und 0,7 g Soda wurden in 50 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 0,5 g Trypsin (Grübler) und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XIX.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Trypsinlösung in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Benzoyl-dl-leucyl- glycinlösung mit gekochter Trypsinlösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,0274	0,0272	0,0298	
20	0,3762	0,0274	0,0301	0,3483
44	0,4292	0,0274	0,0301	0,4016
68	0,4293	0,0272	0,0304	0,4019

Versuch 5.

0,5 g Benzoylglycylglycin (Curtius, 1902) und 0,72 g Soda wurden in 50 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 0,5 g Trypsin (Grübler) und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XX.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Trypsinlösung in mg	abgespaltener Amino-N in mg
0	0,0298	0,0298	
20	0,0298	0,0298	0
44	0,0298	0,0298	0
68	0,0302	0,0302	0

Wie Tabelle XVI, XVII, XVIII, XIX und XX zeigen, werden Benzoylglycyl-dl-phenylalanin, Benzoyl-dl-leucylglycin, Benzoylglycyl-l-phenylalanin und Benzoylglycyl-l-leucin durch Trypsin (Grübler) hydrolysiert, während Benzoylglycylglycin dadurch nicht gespalten wird. Bei der racemischen Verbindung verläuft die Spaltung asymmetrisch.

Versuch 6.

2 g Benzoylglycyl-dl-phenylalanin wurden in 200 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 1 g Trypsin, 2 g Soda und etwas Toluol 3 Tage lang bei 37°C. digeriert. Darauf wurde die Flüssigkeit filtriert, mit Schwefelsäure angesäuert und im Kumagawa-Sutosen Extraktionsapparat 3 Tage lang mit Äther extrahiert.

Die schwefelsaure Flüssigkeit wurde durch Barytwasser quantitativ von der Schwefelsäure befreit und der Niederchlag abfiltriert. Das Filtrat war deutlich linksdrehend. Aus diesem Filtrat wurde l-Phenylalanin als Pikrat erhalten, welches bei 174°C. schmolz.

Die ätherische Lösung wurde verdünstet und der Rückstand mit heissem Petroleumäther, welcher nur Benzoesäure löst und Hippursäure zurücklässt, extrahiert. Nach dem Abdampfen des Petroleumäthers war keine Benzoesäure mehr vorhanden. Der in Petroleumäther unlösliche Rückstand wurde in verdünnter Soda-lösung gelöst und mit Salzsäure angesäuert, wobei die Hippursäure, die bei 187°C. schmolz, in schönen Krystallen ausschied. Nach diesen Resultaten ist sicher, dass die Spaltung von Benzoylglycyl-dl-phenylalanin durch Trypsin an Stelle der Peptidbindung stattfindet.

VI. WIRKUNG DES PANKREATINS AUF BENZOYL- dl-LEUCYLGLYCIN.

0,5 g Benzoyl-dl-leucylglycin und 0,69 g Soda wurden in 50 cem Wasser gelöst und unter Zusatz von 0,5 g Pankreatin und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XXI.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Pankreatin- lösung in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Benzoyl-dl-leucyl- glycinlösung mit gekochter Pankreatin- lösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,0905	0,0905	0,0905	
20	0,4748	0,1243	0,0905	0,3505
46	0,5417	0,1409	0,0905	0,4008
68	0,5417	0,1695	0,0905	0,3722

Aus Tabelle XXI ist ersichtlich, dass Benzoyl-dl-leucylglycin durch Pankreatin abgebaut wird.

VII. WIRKUNG DES PANKREASSAFTES AUF BENZOYLGLYCYL-dl- PHENYLALANIN UND BENZOYL-dl-LEUCYLGLYCIN.

Der Pankreassaft wurde der Pankreasfistel entnommen, welche

bei einem kräftigen Hunde nach Pawlow angelegt worden war, und beim Gebrauch mit 0,5%-iger Chlorecalciumlösung aktiviert.

Versuch 1.

0,5 g Benzoylglycyl-dl-phenylalanin und 0,64 g Soda wurden in 50 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 9,5 ccm Pankreassaft und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XXII.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalisches Pankreassafts in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalisches Benzoylglycyl-dl- phenylalaninlösung mit gekochtem Pankreassaft in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,0226	0,0226	0,0226	
20	0,2001	0,0234	0,0226	0,1767
44	0,2558	0,0264	0,0226	0,2294
68	0,3114	0,0264	0,0226	0,2850

Versuch 2.

0,5 g Benzoyl-dl-leucylglycin und 0,69 g Soda wurden in 50 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 0,5 ccm Pankreassaft und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XXIII.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalisches Pankreassafts in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalisches Benzoyl-dl-leucyl- glycinlösung mit gekochter Pankreassaft in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,0226	0,0226	0,0226	
20	0,1884	0,0234	0,0226	0,1650
44	0,2106	0,0286	0,0226	0,1820
68	0,3246	0,0284	0,0226	0,2962

Wie aus Tabelle XXII und XXIII zu ersehen ist, werden

sowohl Benzoylglycyl-dl-phenylalanin, als auch Benzoyl-dl-leucylglycin durch Pankreassaft deutlich abgebaut.

VIII. WIRKUNG DES GEREINIGTEN TRYPSINS AUF BENZOYL-
GLYCYL-DL-PHENYLALANIN UND BENZOYL-DL-
LEUCYLGLYCIN.

In den obigen Versuchen wurde konstatiert, dass die Benzoylderivate der Dipeptide durch alle untersuchten Trypsinpräparate gespalten werden. Um festzustellen, ob die oben genannte Wirkung der Trypsinpräparate dem Trypsin selbst zukomme oder auf ein dem Trypsin beigemengtes Ferment zurückzuführen sei, gebrauchte ich das nach Richard Willstätter und Ernst Waldschmidt-Leitz (Willstätter u. Waldschmidt-Leitz, 1923) gereinigte Trypsin.

5 g Trypsin (Grübler) wurden in 200 ccm Wasser gelöst und nach dem Ansäuern mit 2,4 ccm n-Essigsäure 4,6 g Kaolin hinzugefügt; weiter wurde das Kaolinadsorbat mit 150 ccm 1%-iger Ammoniumphosphatlösung eluiert.

Versuch 1.

0,5 g Benzoylglycyl-dl-phenylalanin und 0,65 g Soda wurden in 45 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 5 ccm gereinigter Trypsinlösung und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XXIV.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Trypsinlösung in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Benzoylglycyl-dl- phenylalaninlösung mit gekochter Trypsinlösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,0113	0,0113	0,0113	
20	0,2034	0,0114	0,0113	0,1920
40	0,2224	0,0114	0,0113	0,2110
65	0,2224	0,0114	0,0113	0,2110

Versuch 2.

0,5 g Benzoyl-dl-leucylglycin und 0,69 g Soda wurden in 45 cem Wasser gelöst und unter Zusatz von 5 cem gereinigter Trypsinlösung und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XXV.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Trypsinlösung in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Benzoyl-dl-leucyl- glycinlösung mit gekochter Trypsinlösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,0113	0,0113	0,0113	
20	0,1921	0,0114	0,0113	0,1807
44	0,2114	0,0114	0,0113	0,2000
68	0,4003	0,0114	0,0113	0,3889

Aus Tabelle XXXIV und XXV geht hervor, dass Benzoyl-glycyl-dl-phenylalanin und Benzoyl-dl-leucylglycin durch gereinigtes Trypsin hydrolysiert werden.

IX. WIRKUNG DES TRYPSINS AUF DIGLYCYL-dl-PHENYLALANIN UND DI-dl-LEUCYLGLYCIN.

Versuch 1.

0,32 g Diglycyl-dl-phenylalanin (Leuchs u. Suzuki, 1904) und 0,52 g Soda wurden in 50 cem Wasser gelöst und unter Zusatz von 0,5 g Trypsin (Grübler) und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XXVI.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Trypsinlösung in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Diglycyl-dl-phenyl- alaninlösung mit gekochter Trypsinlösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,8785	0,0252	0,8785	
18	1,1008	0,0262	0,8785	0,2213
46	1,1675	0,0262	0,8785	0,2880
70	1,2231	0,0288	0,8785	0,3410

Versuch 2.

Di-dl-leucylglycin wurde in folgender Weise dargestellt.

3,5 g dl-Leucylglycin wurden in 54 cem n-Natronlauge gelöst und in der Kälte unter starkem Schütteln 3,5 g Bromisokapronylbromid (in Äther gelöst), auf kleine Portionen verteilt, hinzugefügt. Nachdem der Überschuss des Säurebromids mit Äther entfernt worden war, wurde die wässrige Schicht mit Salzsäure angesäuert und das ausgeschiedene Öl in Äther aufgenommen. Nach dem Abdampfen des Äthers ging das Bromisokapronyl-dl-leucylglycin in farblose Nadeln über. Die Ausbeute betrug 85% der Theorie. Die aus heissem verdünntem Alkohol umkrystallisierten nadelförmigen Krystalle, die bei 159–170°C. (unkorr.) schmolzen, wurden in Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet und analysiert.

0,1717 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniak 9,3 cem n/10 H_2SO_4 .

Ber. für: $\text{C}_4\text{H}_9\cdot\text{CHBr}\cdot\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot\text{CH}(\text{C}_4\text{H}_9)\cdot\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$

7,67% N

Gef.

7,58% N

Bromisokapronyl-dl-leucylglycin wurde mit der 5 fachen Menge wässrigen Ammoniaks (spec. Gew. 0,88) eine Stunde lang

bei 100°C. erhitzt, dann bis zur Trockne verdampft und der Rückstand mit Alkohol vom Ammoniumbromid befreit. Die aus heissem Wasser umkrystallisierte Substanz krystallisierte in kleinen Prismen, die bei 231°C. (unkorr.) schmolzen.

0,1650 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 16,1 cem n/10 H₂SO₄.

Ber. für: C₄H₉CHNH₂.CO.NH.CH(C₄H₉).CO.NH.CH₂.COOH
 13,95% N
 Gef. 13,62% N

0,43 g Di-dl-leucylglycin und 0,38 g Soda wurden in 50 cem Wasser gelöst und unter Zusatz von 0,5 g Trypsin (Grübler) und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XXVII.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Trypsinlösung in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Di-dl-leucylglycin- lösung mit gekochter Trypsinlösung in mg	abgespal- tener N in mg
0	0,8785	0,0252	0,8795	
20	1,1008	0,0262	0,8798	0,2213
44	1,1675	0,0262	0,8798	0,2880
68	1,2231	0,0288	0,8798	0,3410

Wie aus Tabelle XXVI und XXVII ersichtlich ist, wurden Diglycyl-dl-phenylalanin und Di-dl-leucylglycin durch Trypsin (Grübler) hydrolysiert.

X. WIRKUNG DES EREPSINS AUF BENZOYLDIGLYCYL-DL-PHENYLALANIN UND BENZOYLTRIGLYCYL-DL-PHENYLALANIN.

Versuch 1.

Benzoyldiglycyl-dl-phenylalanin wurde in folgender Weise durch Benzoylierung von Diglycyl-dl-phenylalanin dargestellt.

3 g Diglycyl-phenylalanin wurden in 20 ccm Wasser gelöst, mit 20 ccm n-Natronlauge versetzt und mit 2 g Benzoylchlorid und 20 ccm n-Natronlauge in der üblichen Weise behandelt. Die filtrierte alkalische Reaktionsflüssigkeit gab beim Übersättigen mit Salzsäure einen weissen, krystallinischen Niederschlag, welcher abgenutscht, getrocknet und mit Äther gewaschen wurde.

Die aus heissem Wasser umkrystallisierte Substanz stellt farblose Nadeln dar, die bei 202–203°C. (unkorr) schmolzen, sich schwer in Wasser, leicht in Alkohol und gar nicht in Äther lösten und die Fehlingsche Lösung violett färbten.

0,1628 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 12,7 ccm n/10 H₂SO₄.

Ber. für: C₆H₅CO.NHCH₂(CO.NHCH₂CO.NHCH(H₂C₆H₅).COOH
 10,94% N.
 Gef. 10,89% N.

0,59 g Benzoyldiglycyl-dl-phenylalanin und 0,65 g Soda wurden in 45 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 5 ccm Erepsinlösung und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XXVIII.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Erepsinlösung in mg	abgespaltener Amino-N in mg
0	0,0124	0,0124	
24	0,1026	0,0134	0,0892
48	0,2264	0,0236	0,2028
72	0,3155	0,0344	0,2811

Versuch 2.

4 g Diglycyl-dl-phenylalanin wurden in 14 ccm n-Natronlauge gelöst und mit 2,5 g Chloracetylchlorid und 30 ccm n-Natronlauge in üblicher Weise behandelt, dann die nötige Menge Salzsäure

hinzugefügt. Dabei trat ein krystallinischer Niederschlag auf, welcher nach 1-2 stündigem Stehen bei 0°C. abgenutscht und aus heissem verdünntem Alkohol umkrystallisiert wurde.

Die Substanz schmolz bei 172–173°C. (unkorr.)

0,1673 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des

Ammoniaks 13,9 ccm n/10 H₂SO₄.

Ber.f.: $\text{Cl} \cdot \text{CH}_2\text{CO} \cdot \text{NH}(\text{CH}_2\text{CO} \cdot \text{NH}(\text{CH}_2\text{CO} \cdot \text{NH}(\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)\text{COOH}))\text{COOH}$
11,83%N.

Gef. 11,70%N.

5 g Chloracetyldiglycyl-dl-phenylalanin wurden mit 10 ccm wässrigem Ammoniak (von spec. Gew. 0,88) versetzt und 3 Tage lang bei 37°C. stehen gelassen. Dann wurde das Ammoniak verdampft, der Rückstand mit Alkohol vom Chlorammonium befreit und das erhaltene Triglycyl-dl-phenylalanin aus heissem verdünntem Alkohol umkrystallisiert. Die Krystalle stellten farblose Tafeln dar, die bei 234–235°C. (unkorr.) schmolzen und die Fehlingsche Lösung blauviolett färbten.

0,1682 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des

Ammoniaks 16,7 ccm n/10 H₂SO₄.

Ber.f. $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO} \cdot \text{NH}(\text{CH}_2\text{CO} \cdot \text{NH}(\text{CH}_2\text{CO} \cdot \text{NH}(\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)\text{COOH}))\text{COOH}$
16,62%N.

Gef. 16,58%N.

4 g Triglycyl-dl-phenylalanin wurden in 40 ccm n-Natronlauge gelöst und in bekannter Weise mit 4 g Benzoylchlorid und 50 ccm n-Natronlauge behandelt; der beim Ansäuern mit Salzsäure ausgeschiedene Niederschlag wurde aus heissem verdünntem Alkohol umkrystallisiert. Ausbeute 80% der theoretischen Menge.

Die Substanz krystallisierte in Nadeln und löste sich leicht in Alkohol, äusserst schwer in Wasser und gar nicht in Äther. Sie zersetzte sich bei gegen 204–205°C. (unkorr.) und gab die Biuretreaktion.

0,1924 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des

Ammoniaks 17,3 ccm n/10 H₂SO₄.

Ber für: $C_6H_5CO.NHCH_2CO.NHCH_2CO.NHCH_2CO.NHCH_2CO.NH.CH(CH_2C_6H_5)COOH$

12,67%N.

Ger.

12,59%N.

0,67 g Benzoyltriglycyl-dl-phenylalanin und 0,62 g Soda wurden in 45 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 5 ccm Erepsinlösung und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XXIX.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Erepsinlösung in mg	abgespaltener Amino-N in mg
0	0,0122	0,0122	
24	0,0285	0,0122	0,0163
48	0,0855	0,0123	0,0732
96	0,1318	0,0301	0,1017

Wie aus Tabelle XXVIII und XXIX zu ersehen ist, sind sowohl Benzoyldiglycyl-dl-phenylalanin als auch Benzoyl-triglycyl-dl-phenylalanin wie Benzoyldiglycylglycin und Benzoyltriglycylglycin durch Erepsin hydrolysierbar.

XI. WIRKUNG DES TRYPSINS AUF BENZOYLDIGLYCYLGLYCIN.

Versuch 1.

0,52 g Benzoyldiglycylglycin und 0,62g Soda wurden in 50 ccm Wassem gelöst und unter Zusatz von 0,5 g Trypsin (Grübler) und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XXX.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Trypsinlösung in mg	abgespaltener Amino-N in mg
0	0,0298	0,0298	
20	0,0298	0,0298	0
44	0,0304	0,0304	0
68	0,0306	0,0306	0

XII. WIRKUNG DER PROTEOLYTISCHEN FERMENTE AUF DIE DESAMINIERTEN POLYPEPTIDE.

A. Versuche mit Glykolyl-dl-phenylalanin.

Das gebrauchte Glykolyl-dl-phenylalanin wurde auf folgende Weise dargestellt.

5 g Glycyl-dl-phenylalanin wurden in 500 ccm Wasser, dem 30 ccm n-Salzsäure zugefügt worden waren, durch Erwärmen gelöst und mit 4 g Silbernitrit in wässriger Lösung versetzt. Die Flüssigkeit wurde über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen, der entstandene Niederschlag vom Chlorsilber abfiltriert und das Filtrat im Kumagawa-Sutosen Extraktionsapparat mit Äther extrahiert. Der Äther wurde abdestilliert, der Rückstand in wenig heissem Alkohol gelöst und mit Äther versetzt. Dabei schied sich Glykolyl-dl-phenylalanin in amorpher Masse aus. Ausbeute 0,8 g.

0,1641 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des
Ammoniaks 7,5 ccm n/10 H_2SO_4 .

Ber. für: $(\text{OH})\text{CH}_2\text{CO.NH.CH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)\text{COOH}$	6,28% N.
Gef.	6,39% N.

Nach monatelangem Stehen bei Zimmertemperatur schied sich nach Abdampfen des Äthers Glykolyl-dl-phenylalanin in farblosen Nadeln aus, die bei 206°C. (unkorr) schmolzen. Die reine Säure löste sich sehr leicht in Alkohol, aber schwer in Äther. Die Lösung reagierte und schmeckte deutlich sauer.

Versuch 1.

0,25 g Glykolyl-dl-phenylalanin, 0,52 g Soda und 0,5 g Trypsin wurden in 50 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 0,5 g Trypsin und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XXXI.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Trypsinlösung in mg	abgespaltener Amino-N in mg
0	0,0267	0,0267	
20	0,0278	0,0278	0
44	0,0288	0,0278	0,0010
72	0,0286	0,0286	0

Versuch 2.

0,25 g Glykyl-dl-phenylalanin und 0,52 g Soda wurden in 45 cem Wasser gelöst und unter Zusatz von 5 cem Erepsinlösung und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XXXII.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Erepsinlösung in mg	abgespaltener Amino-N in mg
0	0,0132	0,0132	
20	0,0132	0,0132	0
44	0,0354	0,0354	0
72	0,0362	0,0350	0,0012

Aus Tabelle XXXI und XXXII ist ersichtlich, dass Glykyl-dl-phenylalanin weder durch Trypsin noch durch Erepsin hydrolysiert wird.

B. Versuche mit Glykylglycyl-dl-phenylalanin.

Glykylglycyl-dl-phenylalanin wurde wie beim Glykyl-dl-phenylalanin durch die Desaminierung von Diglycyl-dl-phenylalanin dargestellt.

3 g Diglycyl-dl-phenylalanin wurden in 250 cem Wasser gelöst,

mit 20 ccm n-Salzsäure übergossen, dazu 2 g Silbernitrit gefügt und in ganz gleicher Weise wie beim Glykolyl-dl-phenylalanin behandelt. Die vom Chlorsilber abfiltrierte saure Reaktionsflüssigkeit wurde im Kumagawa-Sutoschen Extraktionsapparat mit Äther extrahiert. Dabei schied sich Glykolylglycyl-dl-phenylalanin am Boden des Kolbens in tafelförmigen Krystallen aus. Die ätherische Lösung wurde von den Krystallen abgetrennt, der Äther abdestilliert und der Rückstand in wenig Alkohol gelöst und mit Äther gefällt. Dabei schied sich wieder Glykolylglycyl-dl-phenylalanin in amorpher Masse aus. Die unreine Säure löste sich sehr leicht in Wasser und Alkohol und etwas schwerer in Äther. Die aus dem Äther krystallinisch ausgeschiedene Masse war dagagen in Wasser schwer löslich.

0,1894 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 13,1 ccm n/10 H_2SO_4 .

Ber. für: $(\text{OH})\text{CH}_2\text{CO.NHCH}_2\text{CO.NHCH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)\text{COOH}$ 10,00% N.
 Gef. 9,68% N.

Versuch 1.

0,32 g Glykolylglycyl-dl-phenylalanin und 0,52 g Soda wurden in 50 ccm Wasser gelöst, mit 0,5 g Trypsin und etwas Toluol versetzt und das Gemisch bei 37°C. digeriert.

TABELLE XXXIII.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Trypsinlösung in mg	abgespaltener Amino-N in mg
0	0,0264	0,0264	
20	0,0372	0,0272	0,0100
44	0,0386	0,0284	0,0102
78	0,0406	0,0284	0,0122

Versuch 2.

0,32 g Glykolyl-glycyl-dl-phenylalanin und 0,52 g Soda wurden in 45 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 5 ccm Erepsinlösung und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XXXIV.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 ccm sodaalkalischer Erepsinlösung in mg	abgespaltener Amino-N in mg
0	0,0124	0,0124	
18	0,0134	0,0132	0,0002
46	0,0236	0,0236	0
70	0,0288	0,0280	0,0008

Aus Tabelle XXXIII und XXXIV geht hervor, dass Trypsin Glykolyl-glycyl-dl-phenylalanin, wenn auch nur in geringem Grade, spaltet, während es durch Erepsin gar nicht hydrolysiert wird.

C. Versuche mit Leukolylglycin.

Leukolylglycin wurde in folgender Weise dargestellt.

1) Wie bei der Darstellung von Glykolyl-dl-phenylalanin wurden 5 g Leucylglycin in 300 ccm Wasser gelöst und mit 30 ccm n-Salzsäure und 4 g Silbernitrit desaminiert.

2) 3 g Bromisokapronylglycin wurden in 100 ccm Wasser gelöst, unter Erwärmen 6,5 g frisch gefälltes Silberoxyd einge-
tragen und einige Stunden auf dem Wasserbad gehalten. Nach dem Erkalten wurde die Lösung abgesaugt. Das Filtrat wurde mit Salzsäure angesäuert und im Kumagawa-Sutoschen Extraktionsapparat mit Äther extrahiert. Nach den Abdampfen des Äthers wurde Leukolylglycin in amorpher Masse erhalten. (Ausbeute 1,8 g.).

Leukolylglycin ist in Wasser und Alkohol leicht, in Äther ziemlich schwer löslich. Die wässrige Lösung reagiert stark sauer, und löst Zinkoxyd beim Kochen. Beim Eindampfen dieser Lösung schied sich das Zinksalz des Leukolylglycins in feinen Tafeln aus.

0,1963 g Substanz verloren beim Trocken 0,083 g Wasser

Ber. für: $(C_4H_9CH.OH.CO.NH.CH_2.COO)_2Zn.H_2O$ 3,92% H_2O
 Gef. 4,23% H_2O

0,1342 g Substanz gaben 0,0204 g ZnO

Ber. für: $(C_4H_9CH.OH.CO.NH.CH_2.COO)_2Zn$ 14,80% Zn
 Gef. 15,20% Zn

Versuch 1.

0,25 g Leukolylglycin und 0,38 g Soda wurden in 50 cem Wasser gelöst und unter Zusatz von 0,5 g Trypsin und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XXXV.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Trypsinlösung in mg	abgespaltener Amino-N in mg
0	0,0269	0,0269	
18	0,0164	0,0164	0
32	0,0310	0,0310	0
72	0,0310	0,0298	0,0012

Versuch 2.

0,25 g Leukolylglycin und 0,38 g Soda wurden in 45 cem Wasser gelöst und unter Zusatz von 5 cem Erepsinlösung und etwas Toluol bei 37° digeriert.

TABELLE XXXVI.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Erepsinlösung in mg	abgespaltenen Amino-N
0	0,0122	0,0122	
18	0,0124	0,0124	0
32	0,0234	0,0230	0,0004
42	0,0342	0,0342	0

Aus Tabelle XXXV und XXXVI ersichtlich, dass Leukolyglycin weder durch Trypsin noch durch Erepsin hydrolysiert wird.

D. Versuche mit Leukolylleucylglycin.

3 g Dileucylglycin wurden in 25 cem heisser n-Salzsäure gelöst, mit 3,3 g Silbernitrit in ganz gleicher Weise wie beim Leukolyglycin behandelt und mit Äther extrahiert. Der nach dem Abdampfen des Äthers zurückgebliebene Rückstand wurde wieder in Äther gelöst und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dabei schied sich nach dem Verdunsten des Äthers Leukolylleucylglycin teils in Nadeln, teils in amorpher Masse aus. Die noch einmal aus Äther umkrystallisierte Säure löste sich leicht in Alkohol und Wasser und ziemlich schwer in Äther.

0,1992 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 7,0 cem. n/10 H_2SO_4 .

Ber. für: $\text{C}_4\text{H}_9\cdot\text{CH}\cdot\text{OH}\cdot\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot\text{CH}(\text{C}_4\text{H}_9)\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot\text{CH}_2\text{COOH}$

7,91%N.

Gef.

7,55%N.

Versuch 1.

0,43 g Leukolylleucylglycin und 3,8 g Soda wurden in 50 cem Wasser gelöst und unter Zusatz von 0,5 g Trypsin und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XXXVII.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Erepsinlösung in mg	abgespaltener Amino-N in mg
0	0,0268	0,0268	
24	0,0388	0,0282	0,0106
48	0,0402	0,0282	0,0120
72	0,0403	0,0284	0,0119

Versuch 2.

0,43 g Leukolylleucylglycin und 0,38 g Soda wurden in 45 cem Wasser gelöst, mit 5 cem Erepsinlösung und etwas Toluol versetzt und das Gemisch bei 37°C. digeriert.

TABELLE XXXVIII.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungs- flüssigkeit in mg	Amino-N in 2 cem sodaalkalischer Erepsinlösung in mg	abgespaltener Amino-N in mg
0	0,0124	0,0124	
24	0,0226	0,0226	0
48	0,0236	0,0236	0
72	0,0302	0,0302	0

Wie aus Tabelle XXXVII und XXXVIII ersichtlich ist, wird Leukolylleucylglycin durch Trypsin mehr oder minder gespalten, nicht aber durch Erepsin.

Zum Schluss möchte ich Herrn Dr. Prof. K. Mayeda meinen wärmsten Dank für seine unermüdlliche und sorgfältige Leitung bei meinen Versuchen aussprechen.

LITERATUR.

- Curtis, Th. (1902): Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., **35**, 3226.
Curtis, T. u. Müller, E. (1904): Journ. f. prakt. Chem., **270**, 223.
Fischer, E. u. Abderhalden, E. (1905): Zeitschr. f. physiol. Chem., **46**, 52.
Fischer, E. u. Brunner, A. (1905): Annal. d. Chem. u. Pharm., **340**, 142.
Fischer, E. u. Brunner, A. (1907): Annal d. Chem. u. Pharm., **357**, 1.
Fischer, E. u. Steiingröver (1909): Annal. d. Chem. u. Pharm., **365**, 167.
Imai, T. (1924): Zeitschr. f. physiol. Chem., **135**, 205.
Imai, T. (1924): Zeitschr. f. physiol. Chem., **136**, 192 u. 205.
Leuchs, H. u. Suzuki, U. (1904): Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., **37**, 3306.
Murachi, R. (1927): Acta schol. med. univer. imp. Kioto, **9**, 269.
Utzino, S. (1928): Journ. of Biochem., **9**, 483.
Willstätter, R. u. Waldschmidt-Leits, E. (1923): Zeitschr. f. physiol. Chem., **125**, 132.

ÜBER DIE CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG DER MENSCHLICHEN EPIDERMIS.

VON

YUTAKA JONO.

(Aus der Medizinischen Klinik der Mandschurischen Medizinischen Hochschule, Mukden. Vorstand: Prof. Dr. K. Morinaka.)

(Eingegangen am 5. Dezember 1928.)

Es ist bekannt, dass die Epidermis, Federn, Haare, Horne und Nägel u.s.w. aus Keratin bestehen, das ziemlich resistent gegen chemische Reagentien bleibt; und dass die anorganische und organische Zusammensetzung der Keratins keinesweges identisch ist bei den verschiedenen Tierarten und den Geweben derselben Tiere.

Die Erforschung der chemischen, besonders der stickstoffhaltigen Bestandteile der menschlichen Epidermis ist dagegen sehr lückenhaft geblieben, wegen der Schwierigkeit, Material in genügender Menge zu bekommen. Ohne auf die zahlreichen Mitteilungen über die Biochemie der menschlichen Epidermis einzugehen, mögen hier nur einige Untersuchungen über die elementare Analyse, über Aschen und Fettbestandteile Erwähnung finden. Über den Aschengehalt der Haut bei weissen und schwarzen Rassen finden John, Abel und Davis, dass dieser bei Schwarzen 2% ist, bei Weissen dagegen 1–1,5% beträgt. Unna, Golodez und Linser haben schon über das Hautfett des Menschen genauer geschrieben. Mulder und Scheler erhielten das fast gleiche Resultat bei der elementaren Analyse und Bestimmung des Aschengehaltes der menschlichen Epidermis und betonen einen niedrigeren Schwefelgehalt derselben als bei anderen Hornsubstanzen. In Bezug auf die Zusammensetzung der Eiweissstoffe der menschlichen Epidermis liegen meines Wissen noch keine Untersuchungen vor. Hierzu einen Beitrag zu liefern, ist der Zweck der nachfolgenden Untersuchung.

UNTERSUCHUNGSMATERIAL.

Als das geeignetste Material für die chemische Untersuchung der menschlichen Epidermis gelten die Hautschuppen scharlachkranker Japaner. Die Häutung wird beim Scharlach bekanntlich von der zwischen der alten und der darunterliegenden neuen Hornschicht vollzogen. Die Hautschuppen bestehen folglich aus abgeworfener Hornschicht, eventuell mit dünnem, homegenen Häutchen; auch histologisch bestätigte sich, dass die angewandten Hautschuppen nur aus Hornschicht gebildet sind.

EXPERIMENTELLER TEIL.

1. Wassergehalt.

Das frisch erhaltene Material verlor beim Trocknen bei 105°C eine Stunde lang im Minimum 18,69%, im Maximum 21,26%, durchschnittlich also 20,02% seines Gewichtes.

2. Anorganische Bestandteile.

Zur quantitativen Analyse des Gesamtaschengehaltes und der einzelnen Aschenbestandteile versuchte ich auf trockenem Wege und löste die Asche in verdünnter Salzsäure, verdünnte sie mit Wasser auf ein bestimmtes Volumen und verwendete einen aliquoten Teil davon, mit einer genau kalibrierten Pipette für die Bestimmungen der einzelnen Stoffe entnommen, und habe die gefundenen Werte der Stoffe auf das Gesamtvolumen des Auszuges umgerechnet.

Zur Bestimmung des Kaliums und des Natriums wurden die beiden Alkalien nach möglichster Entfernung der anderen Aschenbestandteile in Chloride übergeführt, als solche gewogen und dann das Kalium als Kaliumplatinchlorid bestimmt. Durch Subtraktion des Chlorkaliums von dem vorher gefundenen Gewichte der Summe der beiden Chloralkalien wurde die Menge des Chlornatriums gefunden.

Das Calcium wurde aus einer mit essigsaurem Natron versetzten Lösung durch oxalsaures Ammon als oxalsaurer Kalk gefällt, durch starkes Glühen in Ätzkalk übergeführt und dann

gewogen als Calciumoxyd. Aus der vom Calciumoxalat abfiltrierten Lösung fällte man das Magnesium durch Übersetzung mit Ammoniak als phosphorsaure Ammonmagnesia aus, verwandelt die letztere auf die übliche Weise durch Glühen in pyrophosphorsaure Magnesia und berechnete aus der gewogenen pyrophosphorsauen Magnesia die Magnesia.

Zur Bestimmung der Kieselsäure übergoss man die Asche mit Salzsäure und digerierte sie bis zur Lösung, verdämpfte dies bis zur Trockenheit und erhitzte sie im Wasserbade, bis keine sauren Dämpfe mehr entwichen, digerierte den Rückstand mit Salzsäure auf dem Wasserbade einige Zeit, verdünnte ihn dann mit Wasser, und brachte die allein ungelöst bleibende Kieselsäure auf ein kleines Filter, gut gewaschen, getrocknet, gegläht und gewogen dann nach dem Erkalten über Schwefelsäure.

Den Gesamtschwefelgehalt bestimmte ich nach der Benedict-Denissehen Methode, Eisen oxydimetrisch mit Permanganat. Zum Nachweis des Arsens verwandte ich die Marsch-Berzelius-Liebigsche Methode.

TABELLE I.

Gesamtasche	1,52%
Kalium	14,94 „
Natrium	13,31 „
Calcium	5,15 „
Magnesium	11,53 „
Kieselsäure	18,40 „
Schwefel	0,78 „
Eisen	0,05 „
Arsen	Spur.

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, kommt unter dem Aschengehalt in grösserer Menge Kieselsäure vor. Die Werte des Schwefels sind dagegen viel niedriger als in anderen Keratin-substanzen z.B. bei Menschenhaaren 5% und Nägeln 2,8%.

3. Fettartige Substanz.

Den Gesamtfettgehalt der Epidermis bestimmte ich nach den Kumagawa-Sutoschen Methoden; die minimalen Werte sind 1,95%, die maximalen Werte 2,51%, Mittelwerte 2,22%.

Um die fettartige Substanz zu erhalten, extrahierte ich die Menschenepidermis zuerst mit heissem Alkohol und habe sie dann mit Aether wiederholt behandelt. Der Destillationsrückstand wurde durch abermaliges Auflösen in Aether, Filtrieren und Abdestillieren gereinigt. Auf diese Weise wurde eine bräunliche wachsartig aussehende Masse gewonnen. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Zahlen, die in gleichnamigen Ziffern für Fett des subkutanen Fettgewebes und Haarfett des Menschen und des Schlangenhemdes angeführt sind.

TABELLE II.

	Autor. Epidermis des Menschen.	Glikin. Subkutane Fettgewebe des Menschen.	Glikin. Haare des Menschen.	Oikawa. Schlan- genhemd.
Säurezahl	5,1	—	—	19,3
Verseifungszahl	106,9	193-199	200,0	104,9
Jodzahl	15,8	52,7	67,0	20,0
Azetylzahl	19,4	—	—	19,3
Reichert- Meisslesche Zahl	2,3	2,0	2,3	—
Hehnerssche Zahl	94,9	93,9	93,0	—
Unverseifbares	25,0	—	—	24,88

4. Stickstoffverteilung im Keratin.

Zur Bestimmung von Stickstoffverteilung wurden 3 g gereinigtes Keratin mit Salzsäure hydrolysiert und nach den van-Slykeschen Methoden analysiert.

Es ergab die folgenden Resultate.

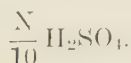
TABELLE III.

Gesamt-N.	14,65 %	Monoamino-N.	10,46 %
Amino-N.	12,64 „	Nichtamino-N.	1,64 „
Humin-N.	1,58 „	Cystin-N.	0,17 „
Ammoniak-N.	0,80 „	Arginin-N.	0,42 „
		Lysin-N.	0,32 „
		Histidin-N.	2,34 „

5. Darstellung der einzelnen Aminosäuren.

Das entfettete Material, 1000 g mit 3000 cem rauchender Salzsäure von spezifischen Gewicht 1,19, wurde an einem Rückflusskühler 6 Stunden lang erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die gebildete Huminsubstanz abfiltriert und mit Wasser ausgewaschen. Das Filtrat und Waschwasser wurden vereinigt und unter vermindertem Druck eingeeengt und möglichst von der überschüssigen Salzsäure befreit. Darauf wurde der Rückstand in einer ziemlich grossen Menge Wasser gelöst, mit Tierkohle ausgekocht und mit 33% Natronlauge bis zur schwach sauren Reaktion versetzt. Nach mehrtägigem Stehen filtriert man die Krystallisation, welche im wesentlichen aus Tyrosin und Cystin besteht, ab, löst sie in heissem, 10%igen Ammoniak, kühlt ab und fügt Eisessig bis zur schwach alkalischen Reaktion hinzu. Es fällt zunächst Tyrosin aus, welches nach mehrmaliger Umkrystallisation aus heissem Wasser mit Tyrosin gut übereinstimmende Analysenwerte gab.

0.1315 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks nach Kjeldahl 7.2 cem



Berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$:7,73% N.

Gefunden:7,66% N.

Aus der Mutterlauge schied sich nach Übersättigen mit Eisessig Cystin ab; Lösung und Fällung wurde mehrmals wiederholt, bis es keine Millonsche Reaktion mehr gab, und danach wurde analysiert.

0,1138 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 9,2 cem $\frac{N}{10}$ H_2SO_4 .

0,1468 g Substanz gaben 0,2833 g $BaSO_4$.

	Berechnet für:	Gefunden:
N:	11,24%	11,32%
S:	26,70%	26,51%

Andererseits wurden 500 g mit 2500 cem 25 volumprozentiger Schwefelsäure am Rückflusskühler 16 Stunden lang erhitzt, nach dem Abfiltrierten der Huminsubstanzen mit Tierkohle gekocht und mit CaO neutralisiert.

Beide neutralisierten Hydrolysenflüssigkeiten wurden vereinigt und bei niedriger Temperatur auf einen Liter eingengt. Dabei schieden sich noch reichlich Krystalle von Tyrosin aus. Die von der Hauptmasse des Tyrosins abfiltrierte Flüssigkeit wurde mit Schwefelsäure bis zum Gehalt von 5% versetzt, mit 25%iger Phosphorwolframsäure ausgefällt und mit 5%iger Schwefelsäure gründlich ausgewaschen. Das Filtrat und Waschwasser wurden vereinigt und als Monoaminosäurenfraktion, das Phosphorwolframatniederschlag als Basenfraktion bezeichnet.

BASENFRACTION.

Die durch Phosphorwolframsäure abgeschiedene Fällung wurde in bekannter Weise durch Baryt zerlegt und das überschüssige Baryt durch Durchleiten von Kohlensäure entfernt. Das Filtrat und Waschwasser wurden vereinigt, im Vacuum auf ein kleines Volumen eingengt, mit verdünnter Salpetersäure schwach angesäuert, und darauf mit Silbernitratlösung ausgefällt und filtriert. Das Filtrat der Purinbasenfraktion wurde solange

mit Silbernitratlösung versetzt, bis eine Probe der Lösung mit Barytwasser einen braunen Silberoxyd-Niederschlag ergab und dann wurde überschüssiges Barytwasser hinzugefügt. Dann saugte ich die Silberbarytfällung ab und wusch sie sorgfältig mit kaltem, barythaltigen Wasser, bis eine Probe des Filtrates keine Salpetersäurereaktion mehr gab. Der von Salpetersäure befreite Silberniederschlag wurde in schwefelsäurehaltigem Wasser fein suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Vom Filtrate des Silbersulfids und des Baryumsulfates wurde der Schwefelwasserstoff durch Luftdurchleitung, die überschüssige Schwefelsäure durch Baryt, der überschüssige Baryt durch Kohlensäure entfernt, wieder mit Schwefelsäure auf 2,5% versetzt und jetzt das Histidin nach Kossel und Patten durch Quecksilbersulfatlösung gefällt. Der entstandene Niederschlag wurde nach 24stündigen Stehen abfiltriert, in Wasser aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vom Quecksilbersulfid abfiltrierte Flüssigkeit wurde durch Baryt von der Schwefelsäure befreit, mit Salzsäure schwach angesäuert, unter vermindertem Druck stark eingengt und mit heiss gesättigter Pikrolonsäurelösung versetzt. Dabei schied sich eine geringe Menge eines fein nadelförmigen Niederschlags aus; aber ihrer geringen Menge wegen konnte ich keine Analyse ausführen; ob dieses Pikrolonat mit Histidinpikrolonat identisch ist, muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Das Filtrat der Histidinquecksilbersulfatfällung wurde mit Schwefelwasserstoff von Quecksilber befreit, nach Entfernung des Schwefelwasserstoffs die Schwefelsäure mit Baryt und das überschüssige Baryt mit Kohlensäure entfernt. Darauf wurde die Flüssigkeit bei niedriger Temperatur eingengt und mit kalt gesättigter Pikrinsäurelösung bis zur schwach sauren Reaktion versetzt; dabei schieden sich lange, seidenglänzende, goldgelbe Nadeln aus, welche nach der Umkrystallisation aus heissem Wasser unter Zersetzung bei 207°C schmolzen.

0,1115 g Substanz ergaben 24,4 ccm feuchten Stickstoffs bei 26°C und 260 mm B.

Berechnet für $C_6H_{14}N_4O_2$. $C_6H_3N_3O_7$: 24,31% N.

Gefunden: 24,15% N

Das Filtrat von Histidin und Argininfraktionsfällung wurde mit Schwefelsäure schwach angesäuert, durch Schwefelwasserstoff vom Silber befreit und unter vermindertem Druck auf ein kleines Volumen eingeeengt. Die Flüssigkeit wurde hierauf mit soviel Schwefelsäure angesäuert, dass der Schwefelsäuregehalt 5% betrug und wieder mit 25%igen Phosphorwolframsäurelösung gefällt, filtriert und mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschen.

Von den Phosphorwolframatzen wurden die Basen in bekannter Weise frei gemacht und von der alkoholischen Lösung durch Zusatz einer alkoholischen Pikrinsäurelösung als Pikrate isoliert. Die aus Wasser umkrystallisierte Substanz ergab folgende mit Lysinpikrat übereinstimmende Analysenzahl:

0,1350 g Substanz ergaben 22,9 ccm feuchten
Stickstoffs bei 25°C und 756 mm B.

Berechnet für $C_6H_{14}N_2O_2$. $C_6H_3N_3O_7$: 18,66% N.

Gefunden: 18,72% N.

Die Purinbasenfällung wurde in der bekannten Weise behandelt, aber mit negativem Resultate auf Purinbasen verarbeitet.

MONOAMINOSÄURENFRAKTION.

Das Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung wurde mit Baryt von der überschüssigen Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure befreit, das überschüssige Baryt durch Kohlensäure entfernt und dann eingeeengt. Dabei schieden sich noch Tyrosin welches mit den vorher erhaltenen vereinigt und analysiert wurde, sowie reichliche Krystallblättchen aus, welche nach mehrmaliger Umkrystallisation mit Leucin gut übereinstimmende Analysenwerte gaben:

0,1428 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 10,9 ccm $\frac{N}{10}$ H_2SO_4 .

Berechnet für $C_6H_{13}NO_2$:10,68% N.

Gefunden:10,68% N.

Das Filtrat von Trysin und Leucin wurde zur Sirupskonsistenz eingedampft, der Rückstand mit dem etwa fünffachvolumigen absoluten Alkohol ausgekocht, die ungelöst gebliebenen Salze abgesaugt und im Vacuum eingengt. Die Behandlung wurde solange wiederholt, bis beim Auskochen mit absolutem Alkohol keine Salze ungelöst zurückblieben. Darauf wurden die im absoluten Alkohol gelösten Aminosäuren nach E. Fischer's Estermethode mit gasförmiger Salzsäure verestert.

Dabei schied sich aber kein Glykokollesterchlorhydrat aus. Nun wurde die Lösung im Vacuum zu dicker Sirupskonsistenz eingengt, die Ester mit Natronlauge und Natriumcarbonat in Freiheit gesetzt und in Aether aufgenommen und nach der Destillation des Aethers die Ester fraktionierter Destillation unterworfen.

Ausbeute.

1. Fraktion 55–60°C 12 mm Druck 5 g
2. Fraktion 90–105°C 12 mm Druck 45 g
3. Fraktion 140–145°C 10 mm Druck ... 19 g
4. Fraktion 180–200°C 8 mm Druck 20 g

Die Verseifung des Ester sowie die Isolierung und die Identifizierung der einzelnen Aminosäuren erfolgten in der üblichen Weise.

1. *d-Alanin*.

0,1325 g Substanz ergaben 0,04434 g CuO.

Berechnet für $(C_3H_6O_2N)_2Cu$: ..26,53% Cu.

Gefunden:21,16% Cu.

0,1224 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks $10,1 \text{ ccm } \frac{1}{10} N H_2SO_4$.

Berechnet für $(C_3H_6O_2N)_2Cu$:11,68% N.

Gefunden:11,55% N.

Eine wässrige Lösung dieser freien Aminosäure dreht das polarisierte Licht nach rechts.

2. *l-Leucin*.

3. *Valin und Isoleucin*.

Jedes nach der Verseifung bis zur Trockenheit eingedämpfte Aminosäurengemisch der 1. 2 und 3. Esterfraktion wurde einzeln mit absolutem Alkohol wiederholt gekocht und dann in der bekannten Weise in Kupfersalze übergeführt. Die Kupfersalze der drei Fraktionen wurden jede für sich mit Methylalkohol erschöpfend extrahiert. Die gesammelten methylalkoholischen Auszüge wurden von Alkohol befreit, die hauptsächlich aus Valin und Isoleucinkupfer, die in Methylalkohol unlöslichen Kupfersalze aus Leucin bestanden.

0,1214 g Kupfersalz gaben 0,0296 g CuO.

Berechnet für $(C_6H_{12}N_2O)_2Cu$: ..19,63% Cu.

Gefunden:19,43% Cu.

0,1214 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 7,5 ccm $\frac{N}{10}$ H_2SO_4 .

Berechnet für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$:8,65% N.

Gefunden:8,53% N.

Das blauviolette methylalkoholische Kupfersalz wurde aus Wasser umkrystallisiert. Die Kupfer- und Stickstoffbestimmung ergab die auf ein Gemisch von Isoleucin und Valinkupfer passende Analysenzahl:

0,1210 g Substanz ergab 0,0294 g CuO.

0,0988 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 6,5 ccm $\frac{N}{10}$ H_2SO_4 .

Berechnet für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$: 19,63% 8,65% N.

Berechnet für $(C_5H_{10}NO_2)_2Cu$: 21,49% 9,47% N.

Gefunden:19,40% 9,21% N.

Aber die Menge der Kupfersalze war zu gering, um die Trennung des Valins von Isoleucin herbeizuführen.

4. *l-prolin.*

Die nach der Verseifung der 1. 2. und 3. Esterfraktion entnommenen, in absoluten Alkohol löslichen Aminosäuren wurden in Kupfersalze verwandelt. Die Kupfersalze wurden nunmehr mit absolutem Alkohol ausgekocht und vom ungelösten abfiltriert. Das dabei auskrystallisierte blaue Kupfersalz ergab den folgenden Kupfer- und Stickstoffgehalt:

0,1210 g Substanz ergab 0,0333 g CuO.
 Berechnet für $(C_5H_8NO_2)_2Cu$: ... 21,80% Cu.
 Gefunden: 21,90% Cu.
 0,1005 g Substanz versbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 6,9 cem $\frac{N}{10}$ H₂SO₄.
 Berechnet für $(C_5H_8NO_2)_2Cu$: 9,60% N.
 Gefunden: 9,61% N.

Eine wässrige Lösung der freien Aminosäure dreht das polarisierte Licht nach links.

5. *dl-Prolin.*

Das in Alkohol unlösliche Kupfersalz wurde aus Wasser umkrystallisiert. Es ergab folgende mit Prolinkupfer übereinstimmende Analysenzahl:

0,1100 g Substanz ergab 0,0303 g CuO.
 Berechnet für $(C_5H_8NO_2)_2Cu$: ... 21,80% Cu.
 Gefunden: 22,00% Cu.
 0,1134 g Substanz versbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 9,8 cem $\frac{N}{10}$ H₂SO₄.
 Berechnet für $(C_5H_8NO_2)_2Cu$: 9,60% N.
 Gefunden: 9,62% N.

6. *l-Phenylalanin.*

Das Phenylalanin aus der 4. Fraktion wurde nach der Verseifung des Esters mit Salzsäure als Chlorhydrat isoliert. Das im Vacuum über Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Präparat ergab folgende Analysenwerte:

0,1350 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 6,8 ccm $\frac{N}{10}$ H_2SO_4 .

Berechnet für $C_9H_{11}O_2N$. HCl:6,95%N.

Gefunden:7,09%N.

Eine wässrige Lösung zeigte Linksdrehung.

Die von Phenylalaninester abgetrennten Ester der übrigen Aminosäuren wurden mit Baryt verseift. Aus der verseiften Lösung schied sich kein asparaginsaures Baryum aus.

7. *Glutaminsäure.*

Aus dem Filtrat des asparaginsauren Baryums wurde, nach der quantitativen Entfernung des Baryts durch Schwefelsäure, nach dem üblichen Verfahren Chlorhydrat isoliert und analysiert.

0,1125 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 6,1 ccm $\frac{N}{10}$ H_2SO_4 .

Berechnet für $C_5H_9NO_4HCl$:7,63%N.

Gefunden:7,60%N.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Der Wassergehalt ist durchschnittlich 20%.
2. Der Aschengehalt der Epidermis beträgt 1,5%. Bei der schwarzen Rasse ist der Aschengehalt 2%, bei der weissen 1–1,5%. Also liegt die durch vorliegende Versuche festgestellte Zahl zwischen den beiden vorhergenannten. Unter den Aschenbestandteilen ist der Kieselsäuregehalt relativ gross, dagegen ist Schwefel nur 0,78%, dass ist viel weniger als in anderen Horngebewen (Haare, Nägel usw.)
3. Der Fettgehalt ist 2%.
4. Als Spaltungsprodukte des Eiweisses der Menschenepidermis nach Säurehydrolyse konnten mit Sicherheit folgende Aminosäuren nachgewiesen werden: Tyrosin, Cystin, Leucin, Alanin, Phenylalanin, Valin und Isolencin, Prolin, Glutaminsäure, Hiditin?, Arginin und Lysin.

Zum schlusse möchte ich Herrn Prof. Dr. K. Morinaka meinen verbindlichsten Dank aussprechen für die grosse Liebenswürdigkeit, mit der er mich bei der Ausführung meiner Versuche beraten hat.

LITERATUR.

- Benedict-Denis: J. biolog. ch. **6**, 363.
 Fischer u. Dörpingshaus: H.-S. **36**, 462.
 Fischer: ebenda **33**, 151; 412.
 Glikin: Chemie der Fette, Lipoide u. Wachsarten.
 John, Abel u. Devis: J. exp. Med. **1**, 381.
 Kossel u. Kutscher: H.-S. **25**, 175.
 Kossel u. Patten: ebenda **38**, 39.
 Mulder: Versuche einer allg. phys. ch.
 Oikawa: Tohoku J. exp. Med. **2**.
 Oikawa: J. of Bioch. **5**, 57.
 Scheler: Ann. ch. pharm. 40-55.
 Unna u. Golodetz: B. Z. **20**, 469.

STUDIES ON THE HEMATOPORPHYRIN HEMOLYSIS.

BY

HASHIME KAWAI.

*(From the Biochemical Institute, Tokyo Imperial University.
Director: Prof. Samuro Kakiuchi.)*

(Received for publication, July 16, 1928.)

INTRODUCTION.

The the suspension of well washed erythrocytes, which has been sensitised with hematoporphyrin easily hemolyses upon exposure to sunlight is a well known fact and was studied by Hausmann extensively (1908). In his experiment 20 cc. of 0.1 percent suspension of erythrocytes were mixed with 1 cc. of 0.2 percent of hematoporphyrin for 2 hours, and the erythrocytes were washed with saline solution six times by the use of a centrifuge. He showed that the erythrocytes after six times washing, still retained their properties to be hemolysed upon the insolation, while the wash saline solution could not hemolyse the fresh non treated erythrocytes even after 30 minutes of insolation, but caused a complete hemolysis by the further exposure to an are light of the duration a little longer than 1½ hours.

By this experiment it became clear that hematoporphyrin is taken up by the erythrocytes and could scarcely be washed out. He did not attempt to follow the mode of hemolysis in this case.

In the following sections some of results of my experiments are reported, in which I tried to elucidate some phases of the mechanism of hematoporphyrin hemolysis.

I. DO SOME HEMOLYTIC SUBSTANCES APPEAR BY THE SIMULTANEOUS ACTION OF HEMATOPORPHYRIN AND LIGHT?

The fact that the erythrocytes are easily hemolysed by unsaturated fatty acid leads us first to inquire whether it is possible

that the decomposition occurs in some of the lipin constituents of the blood corpuscles and thereby produce some unsaturated fatty acids.

The experiments were therefore made with lecithin obtained from egg, stroma obtained from ox blood corpuscles and many lipin fractions prepared from ox blood corpuscles to determine whether or not these substances produce any hemolytic agent upon insolation.

Egg lecithin, a quite pure sample prepared by Dr. Kishi, was used in 0.5 percent concentration. Stroma, which was obtained by water hemolysis from well washed erythrocytes, was washed repeatedly with a physiological salt solution by means of a centrifuge until the mass became colourless and then diluted with a saline solution to two times its original blood volume.

Several lipin fractions from ox blood corpuscles were separated from the lipid extracted with alcohol ether mixture (3 : 1). The extract obtained by distilling the alcohol-ether mixture was then dissolved in dry ether and filtered. A portion of this ether solution was freed from ether and used for the emulsion (0.7%). To the remaining portion was added several times its volume of acetone and thus the in acetone soluble and insoluble portions were separated. After freeing from ether each portion was used for the preparation of 0.5% emulsion. These substances emulsified by a physiological saline solution were divided into four portions. Into two of them a definite amount of hematoporphyrin solution was added, while to the other two were added the corresponding amounts of physiological salt solution.

Each one of the solutions—with and without addition of hematoporphyrin—was exposed to the sunlight from 3 to 5 hours, while the remaining two were placed in the dark. Then to each tube 10 cc. of a 2% blood corpuscle suspension were added and after about one hour the occurrence of hemolysis was examined.

Hemolysis occurred in none of the test-tubes and therefore the formation of a hemolytic agent from lecithin, stroma of erythro-

cytes and various portions of lipoid constituents of erythrocytes by the irradiation in the presence of hematoporphyrin was excluded.

Next I tried to examine whether or not any hemolytic agents are produced when the blood corpuscles are hemolysed by hematoporphyrin under irradiation. To 10 cc. of a 2% suspension of erythrocytes were accordingly added 0.3–0.5 cc. of a 0.2% hematoporphyrin solution and the mixture was exposed to the sunlight until complete hemolysis resulted. The hemolysed solution thus obtained was added in amounts of 1.0, 2.0 and 3 cc. into 10 cc. of a 2% erythrocyte suspension and laid aside in the dark at room temperature about three hours. Hemolysis, however, did not occur in any of the mixtures.

II. THE RELATION OF THE DURATION OF IRRADIATION NECESSARY TO PRODUCE HEMOLYSIS TO THE AMOUNT OF HEMATOPORPHYRIN PRESENT.

It will be clear from what we have seen in the foregoing paragraphs that the hemolysis occurring by the simultaneous action of sunlight and hematoporphyrin is not brought about by the production of some hemolytically acting agent. The energy of radiation is primarily necessary to invoke the hemolysis.

That the duration of irradiation necessary to produce hemolysis depends on the concentration of the hematoporphyrin used is quite natural and easily observable. I have examined the relation existing between the duration of irradiation and the amount of hematoporphyrin. The purpose of this examination is two-fold. On the one hand it suggests to us what kind of reaction it presents, while on the other it enables us to determine so minute an amount of hematoporphyrin that it can not be estimated colorimetrically.

Methods. To 9 cc. of a 2% erythrocyte suspension one cc. of hematoporphyrin of varying concentrations was added and subjected to irradiation. The source of light consisted of a nitrogen

filled Matzda lamp of 1500 candle power, which was rotated about its axis regularly.

About 45 cm. from this lamp the test tubes were placed circumferential, ensuring thus an equal degree of irradiation to all of the tubes.

When all the test tubes were mounted in their places the light was turned on and the time necessary for complete hemolysis for each test tube was noted. The relation between the concentration of hematoporphyrin and time for complete hemolysis is given in table I and fig. 1.

TABLE I.

Volume of 0.2% hematoporphyrin	0.1	0.09	0.08	0.07	0.06	0.05	0.04	0.03	0.02
2% suspension of erythrocytes	9 cc.	9 cc.	9 cc.	9 cc.	9 cc.	9 cc.	9 cc.	9 cc.	9 cc.
Time for complete hemolysis	m 27.28	m 28.16	m 29.19	m 30.26	m 31.42	m 33.30	m 36.12	m 42.0	m 54.52
Volume of 0.2% hematoporphyrin	0.01	0.009	0.008	0.007	0.006	0.005	0.004	0.003	0.002
2% suspension of erythrocytes	9 cc.	9 cc.	9 cc.	9 cc.	9 cc.	9 cc.	9 cc.	9 cc.	9 cc.
Time for complete hemolysis	m 70.34	m 78.24	m 85.54	m 95.12	m 103.36	m 127.0	m 142.12	m 179.0	m 235.0

In the figure the time needed for complete hemolysis was given by the abscissa, while in the ordinate the corresponding concentration was entered in logarithmic expression.

If the erythrocyte were used from the same species of animal identical values were always obtained. Therefore, once this relation was established we can find the concentration of hematoporphyrin in an unknown solution by determining the time necessary for complete hemolysis in the above mentioned system and by following the concentration of the hematoporphyrin corresponding to it on the curve.

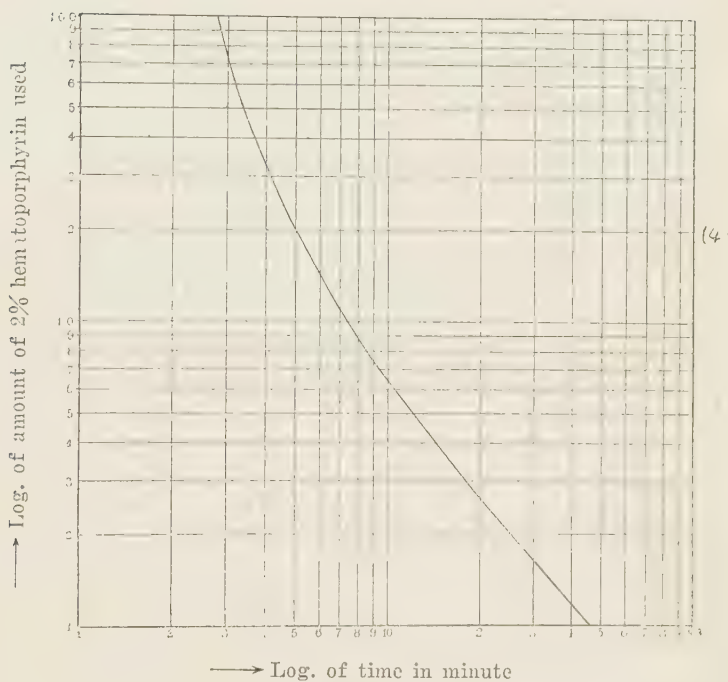


Fig. 1.

III. THE AMOUNT OF HEMATOPORPHYRIN TAKEN UP BY ERYTHROCYTES.

What we saw with the experiments described above in section I in regard to the question of the production of some hemolytic agent from some constituents or red blood corpuscles by the irradiation in the presence of hematoporphyrin suggests to us the possibility that hemolysis occurs only when the hematoporphyrin is taken up by the corpuscles which accelerates the process of hemolysis induced by irradiation.

It is also quite conceivable that the hematoporphyrin is partly taken up by the corpuscles while it remains partly in the solution. The question then arises whether there is a definite relation between the amount of hematoporphyrin taken up by the red cor-

puscles and the time needed for complete hemolysis. If we make an assumption that the energy necessary to disintegrate the structure of red corpuscles remains the same regardless of the amount of hematoporphyrin present, then would the time needed for hemolysis be reciprocally proportional to the amount of hematoporphyrin taken up by the red corpuscles.

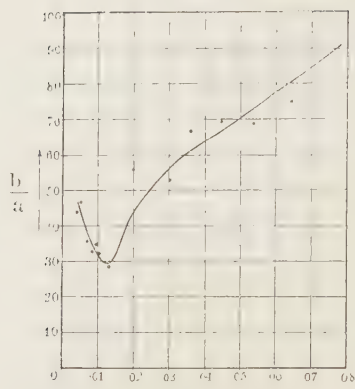
In the following I have first determined the amount of hematoporphyrin taken up by a definite amount of red corpuscles from the solution of various concentration. Then the relation of the amount thus taken up by the corpuscles and the time needed for the complete hemolysis was studied.

For this purpose to 9 cc. of a 2% red corpuscle suspension was added 1 cc. of hematoporphyrin of various concentrations and the mixture was centrifuged after about 5 minutes. The amount of hematoporphyrin remaining in the supernatant fluid was tested by adding the fluid to the red corpuscle paste obtained by centrifugation from 9 cc. of a 2% red corpuscle suspension and by finding the time required to provoke the hemolysis after irradiation of the mixture by standard method. The amount of hematoporphyrin taken up by the red corpuscles is given naturally by the difference between the original amount of hematoporphyrin in the solution and that in the remaining fluid.

This amount divided by the volume of the red blood corpuscles can be taken as the concentration of the hematoporphyrin in the red corpuscles (b in the table II). On the other hand the period of time was measured which elapsed from the moment irradiation began to that of the completion of hemolysis in each mixture consisting of red corpuscle suspension and a different concentration of hematoporphyrin. The time required for complete hemolysis was also measured with the red corpuscles loaded with hematoporphyrin, the solution containing the remaining hematoporphyrin being separated by centrifugation and replaced by the same amount of physiological saline solution. The result is shown in table II.

TABLE II.

Initial amount of hemat. of the solution $\times 10^2$	Amount of erythrocyte	Amount of hemat. remaining in the sol. (a) $\times 10^3$	Amount of hematop. taken up by the red corp. $\times 10^2$	Conc. of hematop. in the red corp. (b)	$\frac{b}{a}$	Time needed for complete hemolysis (t)	t - t ₀
.2	.18	.074	.1260	.07	95.	27.28'' (1648)	208''
.18	"	.0694	.1106	.062	89.	28.16 (1696)	256
.16	"	.0642	.0858	.048	75.	29.19 (1759)	319
.14	"	.0580	.0820	.046	79.	30.36 (1823)	386
.12	"	.0536	.0664	.037	69.	31.42 (1902)	462
.10	"	.0440	.0560	.031	70.	33.30 (2010)	570
.08	"	.0360	.0440	.024	67.	36.12 (2172)	732
.06	"	.0306	.0294	.016	53.	42.0 (2523)	1060
.04	"	.0200	.0200	.0112	56.	54.52 (3202)	1852
.02	"	.0132	.0068	.0038	29.	70.34 (4234)	2794
.018	"	.0114	.0066	.0037	32.5	78.24 (4704)	3264
.016	"	.0098	.0062	.0034	35.	85.54 (5154)	3714
.014	"	.0088	.0052	.0029	33.	95.12 (5712)	4272
.012	"	.0072	.0048	.0026	36.	103.36 (6216)	4776
.010	"	.0054	.0046	.0026	47.	127.0 (7620)	6180
.008	"	.0045	.0035	.0020	44.	142.12 (8532)	7092



Conc. of hematoporphyrin in solution.

Fig. 2.

As can be seen from the table II and as is illustrated also in Fig. 2 the value $\frac{b}{a}$, the ratio between the concentration of hematoporphyrin in the red corpuscle and that in the solution, decreases quite abruptly with the decrease of the concentration of hematoporphyrin in the solution. This suggests to us that the hematoporphyrin is taken up by the red corpuscles and combined there with some of their components.

In Fig. 3 the relation between the amount of hematoporphyrin in the red corpuscle and the time needed for hemolysis is given. This tells us that even when the concentration of hematoporphyrin in the red corpuscle is increased there is a certain time interval until hemolysis occurs. Perhaps this is due to the necessity of the disintegration of the cell structure before the hemolysis occurs and may be different according to the nature of cell resistance.

If we denote this time interval as t_0 and subtracts this amount from the time needed for complete hemolysis in different concentrations of hematoporphyrin in the red corpuscle, $t - t_0$ can be taken as the time needed to produce the same grade of change in the cell with different amounts of hematoporphyrin.

In Fig. 3 the relation between the concentration of hematopor-

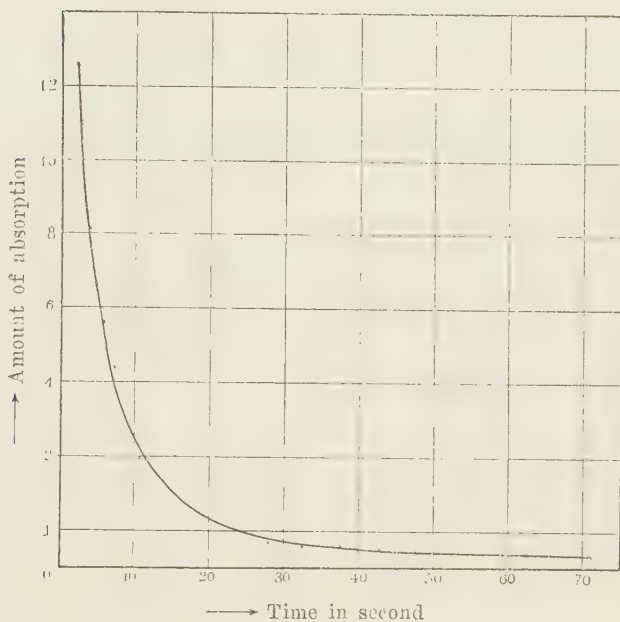


Fig. 3.

phyrin in the red blood corpuscles and the $t-t_0$ value is given graphically.

From the figure it can be seen that the time required to invoke the same grade of change in the corpuscle is reciprocally proportional to the concentration of the hematoporphyrin contained in it. This is what we thought under the assumption that the energy necessary to disintegrate the structure of the red corpuscles comes from irradiation and the result may prove the correctness of the assumption.

IV. THE MODE OF TRANSFER OF HEMATOPORPHYRIN INTO THE RED CORPUSCLE FROM THE SOLUTION.

In the preceding section it became evident that the hematoporphyrin is taken up by red corpuscles and remains there combined with some of their constituents. When, however, we trace the

relation of the amount of hematoporphyrin taken up by the corpuscles with that of the solution in equilibrium with them, the probability becomes quite obvious that both the adsorption and chemical combination may act together.

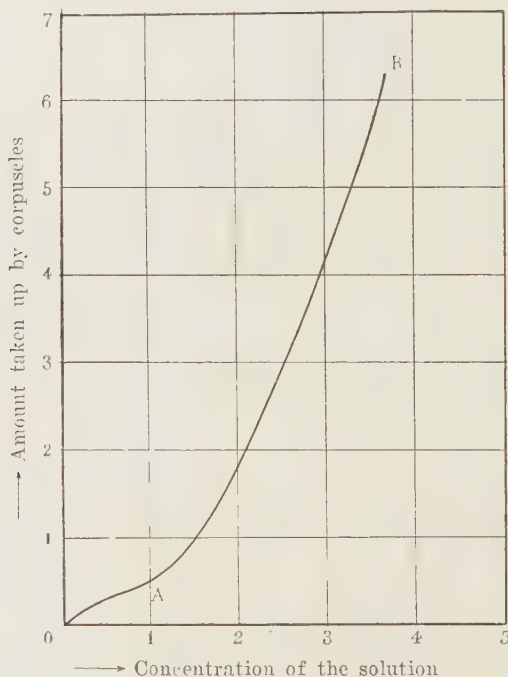


Fig. 4.

Figure 5 suggests to us that when the concentration of hematoporphyrin is small adsorption plays the main rôle and the curve is concave toward the axis of abscissa representing the concentration of the solution (OA part of the curve), while, when the solution is more concentrated the chemical combination becomes an important factor, the curve bending over axis of ordinate representing the concentration of the corpuscle-hematoporphyrin (AB part of the curve).

If we determine two constant K and n in the Freundlich's

adsorption isotherm from the previously mentioned datas, then we will see as is shown in table III, that at a low concentration of hematoporphyrin both values K and n stay extremely constant, the amount of hematoporphyrin taken up by red blood corpuscles coinciding altogether with that corresponding to the adsorption phenomenon. However, if the concentration of hematoporphyrin increases, both values K and n vary gradually and the amount of hematoporphyrin taken up by corpuscles is greater than that the adsorption isotherm requires. Consequently it seems to me most probable that there is some chemical process going on besides the adsorption phenomenon.

TABLE III.

Volume of 0.2% Hematoporphyrin	0.1	0.09	0.08	0.07	0.06	0.05	0.04	0.03	0.02
n	2.0	2.1	2.3	2.55	2.69	2.64	2.19	1.76	1.66
K	0.3275	0.3413	0.3900	0.4438	0.4144	0.3580	0.2054	0.1180	0.1621

Volume of 0.2% Hematoporphyrin	0.01	0.009	0.008	0.007	0.006	0.005	0.004	0.003	0
n	1.6	1.56	1.53	1.52	1.51	1.5	1.5		
K	0.1414	0.1291	0.1201	0.1043	0.1050	0.1186	0.1029		

That the amount of hematoporphyrin taken up by corpuscles is not due simply to a adsorption phenomenon is confirmed by the comparison of the amounts of hematoporphyrin taken up by corpuscles at low and high temperatures.

If it were a simple phenomenon of adsorption more should be taken up at a low temperature than at a high temperature. As is shown in table IV, however, hematoporphyrin is taken up in reality in greater quantity at a high temperature, the remaining solution thus exhibiting a far smaller hemolysing capacity than

TABLE IV.

Conc. of Hematop.	Hemol. time of remaining fluid		Hemol. time of sensitised and washed cells	
	cold	warm	cold	warm
0.005	5-7° 48' 30"	64'	71'	61'
0.01	46'	55'	41'	36.5'
0.05	34'	45'	22.5'	16'
0.1	8' 40"	12' 30"	19'	8'

at the lower. Again the red blood corpuscles charged with hematoporphyrin at a high temperature decompose more rapidly on exposure to light than at the lower.

V. WHAT IS THE ACTION OF INSOLATION ON CORPUSCLES CHARGED WITH HEMATOPORPHYRIN?

It is shown already in section I that there is no substance having hemolytic properties produced in the solution during the insolation of the mixture of blood corpuscles or their constituents and hematoporphyrin. What is then the action of insolation on corpuscles charged with hematoporphyrin? May it involve some process of destruction in the colloidal structure of the corpuscles by radiating energy?

When we add hematoporphyrin in a certain tolerable concentration into the suspension of stroma prepared by water hemolysis, no great change occurs, so long as the mixture is placed in the dark. Upon exposure to sunlight, however, the stroma seem to crumble to a fine powder quite abruptly and the chemical analysis of the supernatant fluid, obtained by the centrifugation of such a mixture at certain intervals after the beginning of insolation reveals the fact, that, as is recorded in table V, both the protein and the lipid content in the supernatant liquid increase as time passes on. From this it may be concluded that the stroma of erythrocytes is disintegrated by the common action of hematoporphyrin and sunlight.

When the mixture of a suspension of red blood corpuscles and hematoporphyrin is exposed to light and examined under a

TABLE V.

2% Stroma suspension	10 cc.	"	"	"	"	"
Cone. of 0.2% Hemat.	0	0.1 cc.	1.0 cc.	0	0.5 cc.	1.5 cc.
Time of insolation	1 hr.	1 hr.	1 hr.	3 hr.	3 hr.	3 hr.
Ether-extract	0.8 mg.	1.9 mg.	2.6 mg.	3.4 mg.	5.1 mg.	7.4 mg.
Biuret reaction	—	—	+	+	+	++

microscope the borders of the cell is getting clearly outlined at first and then all at once seem to disintegrate, its content being passed out abruptly to the outer fluid. The expansion of the cell is quite slight and there is a great difference between this kind of hemolysis and the laking process in hypotonic saline solution, where corpuscles clearly undergo swelling before disruption.

VI. DOES HEMATOPORPHYRIN-INSOLATION TREATMENT REALLY INCREASE PERMEABILITY OF CELL—MEMBRANCE?

Conforming to the observations in the above experiments I presume that the hemoglobin pass out from the corpuscle on account of the disintegration of the stroma. But in order to know if this is due to the effect of hematoporphyrin-insolation in increasing the permeability of the cell membrane I investigated this question with other material. The chosen material was frog muscle. When muscle cells are placed in a slightly hypertonic saline solution containing hematoporphyrin and are placed in the dark, the muscle cells, owing to outflow of water, loose their weight. When, however, the mixture is exposed to sunlight, the muscle tends to increase its weight at first. This is probably due to the increase of permeability to salt, but not to cell colloids, tending the hypertonicity of muscle cells against the milieu. In the later stage the permeability to the larger molecules, as protein

and other substances, also comes in and together with the passing out of these substances, the muscle again loses its weight. This experiments are represented in the table No. VI.

TABLE VI. (a). Weight of muscle.

	Time of insola- tion	hr. 1	hr. 2	hr. 3	hr. 4	hr. 5	hr. 6	hr. 12
Ringer-sol. 0.65% (room dark)	g. 0.2957	g. 0.2968	g. 0.2957	g. 0.28958	g. 0.2847	g. 0.2828	g. 0.2805	g. 0.2855
	Inc. or Dec.	+0.0011	±	-0.00612	-0.011	-0.0129	-0.0152	-0.0102
Ringer-sol. 0.65% 10 cc. + 0.5 cc. HIp. (dark)	g. 0.3144	g. 0.3077	g. 0.3016	g. 0.2959	g. 0.2935	g. 0.2920	g. 0.2886	g. 0.3370
	Inc. or Dec.	-0.0067	-0.0158	-0.0185	-0.0209	-0.0224	-0.0258	-0.0226
Ringer-sol. 0.65% 10 cc. + 0.5 cc. HIp. (light)	g. 0.3150	g. 0.3174	g. 0.3226	g. 0.3236	g. 0.3254	g. 0.3268	g. 0.3280	g. 0.3240
	Inc. or Dec.	+0.0024	+0.0076	+0.0086	+0.0104	+0.0118	+0.0130	+0.0090

TABLE VI. (b). Content of chlorine (Control).

Weight of muscles	Time of insolation	hr. 1	hr. 2	hr. 3	hr. 5	hr. 7
0.2875 g.	0.45 mg. 0.156 %					
0.2932 g.		0.53 mg. 0.180 %				
0.3464 g.			0.67 mg. 0.193 %			
0.3521 g.				0.72 mg. 0.204 %		
0.3480 g.					0.78 mg. 0.223 %	
0.4068 g.						0.88 mg. 0.215 %

TABLE VI. (c)
Content of chlorine (Haematoporphyrin-light).

Weight of muscles	Time of insolation	hr. 1	hr. 2	hr. 3	hr. 6	hr. 7
0.4010 g.	0.59 mg. 0.147 %					
0.4066 g.		0.82 mg. 0.201 %				
0.5108 g.			1.1 mg. 0.215 %			
0.3857 g.				1.2 mg. 0.311 %		
0.4940 g.					2.0 mg. 0.400 %	
0.3817 g.						1.7 mg. 0.447 %

VII. WHAT IS THE MECHANISM OF THE DISINTEGRATION OF THE STRUCTURE OF STROMA?

As it is stated in the above chapter the nature of hemolysis due to the action of hematoporphyrin-insolation is different from that of hemolysis in hypotonic saline solution. Complete destruction of the stroma accompanying the former makes this difference evident. Wishing to clear up in which way the disintegration of stroma proceeds I undertook the following studies. The idea of this investigation was to establish first whether there is any difference in the red blood corpuscles of various animals in their resistance against the action of hematoporphyrin and insolation, and, if so, to determine then what kind of relation, if any, exists between its chemical constitution and the degree of resistance towards hemolysis.

It is a fact known since long ago that the blood corpuscles of various animals have different degrees of sensibility for laking in hypotonic solution or in saponin solution, and that the order of

sensibilities for these two kinds of hemolysis is entirely reverse, the corpuscle the most sensitive to the hypotonic saline solution being the most resistant to the saponine solution. This is set in a scale — commonly called Rywosh series. I ventured therefore to reexamine the Rywosh scale with several common Japanese animals, and to investigate the relation between the Rywosh series thus examined and the sensibility towards hemolysis by hematoporphyrin. Both series, Rywosh's and mine, agree in main features, only two or three points differing in order of priority. This is perhaps due to the difference in the species of Japanese animals and those used by Rywosh, or perhaps to their mode of living. Such question I did not try to solve, and for the time being, constructed a new Rywosh series among these animals. They are represented below:

Rywosh series.

Saponin.

Sheep, goat, ox, cat, grey mouse, pig, grey rat, dog, white rat, rabbit, guinea pig.

Hypotonic saline.

Guinea pig, white rat, dog, grey rat, rabbit, pig, grey mouse, cat, ox, goat, sheep.

New Rywosh series.

Saponin.

Goat, horse, cat, sheep, ox, pig, white mouse, dog, human, blood of placenta, white rat, hen, rabbit, guinea pig.

Hypotonic saline.

Guinea pig, hen, white rat, blood of placenta, human, dog, white mouse, rabbit, pig, ox, horse, sheep, cat, goat.

The sensibility towards the action of hematoporphyrin and the capacity for taking up the hematoporphyrin of red blood corpuscles was determined by the following method. The corpuscles employed for experiments were always obtained by centrifugation

from fresh and mechanically defibrinated blood. They were washed 5 times or more in a physiological saline solution to be freed from serum, being separated by centrifugation after each washing. Finally equal volumes of a physiological saline solution was added to get an equally distributed paste. This was then diluted with a physiological solution to 2% of the paste. 9 cc. of the suspension thus obtained were taken for the experiment and to it was added 0.1 cc. of 2% solution of hematoporphyrin and 0.9 cc. of physiological saline solution, and the mixture was left to stand in the dark for 5 minutes. Then it was placed for irradiation in the same apparatus as is described in the previous section, and the time necessary for complete hemolysis was recorded.

At the same time the other portion of the above mentioned corpuscles and hematoporphyrin was placed in the dark for 5 minutes and centrifuged. The amount of hematoporphyrin re-

TABLE VII.

	Guinea pig	hen	white rat	blood of placenta	human	dog	white mouse
Time for hemolysis	34'.30	35'.0	39'.30	40'.30	40'.30	44'.0	51'.30
Amount of hematop. remaining	0.094	.089	.0674	.0636	.0658	.4538	.0390
Amount of Hp. taken up by corpus.	0.106	.1110	.1326	.1364	.1364	.1462	.1610
	rabbit	pig	ox	horse	sheep	cat	goat
Time for hemolysis	44'.30	44'.0	41'.40	41'.30	37'.0	32'.0	36'.0
Amount of hematop. remaining	.052	.0538	.06	.059	.0794	.116	.0684
Amount of Hp. taken up by corpus.	.148	.1462	.14	.1410	.1206	.084	.1316

maining in the supernatant fluid was determined by the method described above under section II. From this the amount of hematoporphyrin taken up by the corpuscles was calculated and the result is shown in table VII.

According to this table the red blood corpuscles which occupy the left extremity of the new Rywosh series have little capacity to unite with hematoporphyrin, while the hematoporphyrin combining power tends to increase as the position of the corpuscle shifts towards the right in the series. The maximum is attained, however, in the middle of the scale and the combining power begins to decrease then gradually until it becomes the minimum at the right extremity of the series.

As it was stated above the red blood corpuscles which occupy the left extremity of the scale have the greatest capacity of resistance towards a hypotonic saline solution and the farther their position is moved to the right the more their resistance decreases. On the contrary, the resistance for saponin is the greatest on the right extremity and diminishes to the left, that is to say the direction is reverse to that for the hypotonic solution. The capacity for taking up hematoporphyrin is shown to be least on both ends, where the corpuscles are resistant either against hypotonic saline solution or saponin, and the highest combining capacity is found in the middle of the scale.

In order to ascertain whether or not there exists any relation between photosensibility and the chemical constituents of the corpuscles the chemical analysis of corpuscles of a few selected species was undertaken. As to the relation of the chemical composition of the blood corpuscles from the various species of animals to their sensibilities towards hypotonic saline solution and saponin there are several explanations proposed. Particularly the amount of cholesterol or lecithin for hemolysis by saponin and the amount of protein for hemolysis in the hypotonic saline are emphasized, while some authors try to interpret the relation in another way.

I took 5 specimen from the new Rywosh series, chosen at

TABLE VIII. Amount contained in 100 cc. of blood.

	guinea pig		white rat		white mouse		ox		sheep	
Solid substances	12.35 gm.	%	14.24	%	18.055	%	14.00	%	131.7	%
Nitrogen	0.735 gm.	5.96	0.77688	5.45	0.46952	2.55	0.58020	2.0	0.31940	2.42
Hemoglobin	65.5%		60.5%		58.8%		64.5%		75.5%	
Fatty acid	147.0 mg	1.1	96.8 mg	.665	100.4 mg	.555	78.4 mg	.560	74.8 mg	.567
Cholesterol	16.8 mg	.136	27.6 mg	.194	24.3 mg	.135	30.0 mg	.215	38.8 mg	.295

TABLE IX. Amount contained in 100 cc. of blood.

	guinea-pig		white-mouse		sheep	
Solid substances	13.00 gm.	%	16.95	%	13.215	%
Asche	0.76 gm.	6.33	1.89	11.15	0.93	6.27
Hemoglobin	65.7%		60%		75%	
Nitrogen	0.962 gm.	8.35	0.81324	4.8	0.7392	5.6
Fatty acid	98.0 mg	0.81	93.0	0.57	84.0	0.63
Cholesterol	23.2 mg	0.19	32.0	0.18	45.6	0.34
Total phosphoric-acid	31.6 mg	0.26	26.6	0.16	11.0	0.035
Acid soluble { anorg.	6.4 mg	0.04	4.56	0.027	4.6	0.035
P. acid. { org.	0.8 mg	0.007	6.46	0.04	1.0	0.007

a different position in the series and the results of the chemical analysis of their blood corpuscles was compared with the sensibility towards the hypotonic saline solution, saponin and hematoporphyrin-insolation. As is seen from table VIII the content of protein is the largest at the left extremity and tends to decrease always towards the right, while the reverse is true in the case of cholesterol, thus the relation of the amount of these substances to the either hypotonic solution or to the saponine solution seems to be most probable. In the case of hematoporphyrin the content of cholesterol or of protein does not seem to play much of a rôle as the least resistance is shown neither related to the greatest or to the least amount of either of these substances, but is seen where there is a medium quantity of protein and a little cholesterol.

On the other hand at the weak point of resistance solid substances present become particularly abundant. Although with the decrease of proteins and cholesterol these solid bodies seem to increase, we can not jump to a conclusion that sensibility towards hematoporphyrin is related to an increase in these solid substances.

There was a necessity to investigate the connection between the amount of hematoporphyrin taken up and that of solid bodies on account of a difference in the shape and water content of blood corpuscles of various animals. This relation is given in table IX.

All percentage values in the determination of blood corpuscles is highly influenced by the amount of hemoglobin present. Therefore the real knowledge of the composition of endosoma besides hemoglobin and of the stroma is obtained only after the exclusion of hemoglobin. Nevertheless I discarded this method of calculation because the hemoglobin molecule of the different species of animals may differ from each other and the assumed protein content calculated from the hemoglobin value obtained colorimetrically may lead to an erroneous result. The determination of the composition of the stroma obtained by hemolysis and washing has no value, as in this case the endosoma is lost, which may take some part in hematoporphyrin hemolysis.

Besides nitrogenous compounds, lipoids and salts one of the chief constituents of red blood corpuscle is an organic phosphorus compound mainly present in the state of an acid soluble form. Recently Jost (1927) announced that the main part of them is composed of diphosphoglyceric acid.

In order to determine the amount of the organic phosphorus compound and particularly the acid soluble phosphorus compound together with other constituents, I selected 3 species of animals having typical features in hemolysis by hematoporphyrin-insolation, and executed a chemical analysis of them keeping in mind especially on the distribution of phosphorus. The result is shown in table IX.

From this table it is remarkable that the acid soluble phosphorus compound is found in a large amount in those corpuscles which have weak resistance towards hematoporphyrin, while the corpuscles having strong resistance, i.e. corpuscles standing at both extremities of the Rywosh series, contain only a little phosphorus.

As acid soluble phosphoric acids are chiefly in the form of diphosphoglyceric acid and if it exists in the cell in combination with alkali or alkaline earth then it is not difficult to understand that it has a low content of protein and cholesterol with a larger amount of mineral substance.

VIII. DECOMPOSITION OF ACID SOLUBLE PHOSPHORIC ACIDS OF RED BLOOD CORPUSCLES BY THE HEMATOPORPHYRIN-INSOLATION ACTION.

As was found in the previous chapter red blood corpuscles, which have low resistance to hematoporphyrin-insolation, contain more of the acid soluble phosphorus compound than corpuscles with greater resistance. In order to ascertain 1) whether the hematoporphyrin-insolation treatment of the red blood corpuscles is accompanied by a decomposition of the acid soluble phosphorus compound and 2) whether either hemolysis in the hypotonic solu-

tion or the simple exposure to light would produce the same effect on these acids, I carried out the following experiments.

A rabbit's red blood corpuscles were well washed 5 times with physiological saline solution, and were diluted with two volumes of physiological saline solution. Each of several portions of 10 cc. of this suspension was placed in a series of test tubes. Tube No. 1 was left as it was for a control. To No. 2 and No. 3 hematoporphyrin was added; while No. 2 was left in the dark and No. 3 was exposed to light. No. 4 was hemolysed with the addition of water and No. 5 was simply exposed to light. After 1 hour the total acid soluble phosphoric acid compounds and the inorganic phosphorus in test tubes No. 1, 3, 4 and 5 was determined. The amount of organic phosphoric acids was calculated by the difference. In the clear supernatant liquid of test tube No. 2 no acid

TABLE X.
Acid soluble phosphoric acid (in 100 cc. of blood).

50% Rabbit's blood corp. suspension. 100 cc.	Anorg.	Org.	Total
No. 1. Normal (dark)	2.86 mg (20.73%)	10.94 mg (79.27%)	13.80 mg
No. 2. Supernatant liquid of hematoporphyrin (dark)	—	—	—
No. 3. Supernatant liquid of hematoporphyrin (light)	4.32 mg (34.2%)	8.30 mg (65.8%)	12.62 mg
No. 4. Water hemolysis	2.97 mg (24.3%)	9.22 mg (75.6%)	12.19 mg
No. 5. Normal (light) Cells.	2.93 mg (23.9%)	9.32 mg (76.0%)	12.25 mg
Supernatant liquid	—	—	Spur.
No. 6. Hemolysed with water added with Hp.	3.95 mg (35.04%)	7.32 mg (64.95%)	12.12 mg
	3.62 mg (29.9%)	8.50 mg (70.1%)	11.27 mg

soluble phosphoric acid was found. The result of this experiment is shown in table X.

It is obvious from this table that both in case of hemolysis in hypotonic solution and in the case of simple exposure to light, the effect was the same and no decomposition of acid soluble phosphoric acids was observed. In case of hematoporphyrin-insolation treatment, on the contrary, decomposition of acid soluble phosphorus was found to the amount of about 10%. Then the content of tube treated same as No. 4, subjected to hypotonic hemolysis, was divided into two halves and the one was left aside, while the other was subjected to the hematoporphyrin-insolation treatment. The determination of acid soluble phosphoric acids, inorganic phosphorus etc. performed after one hour shows us, as is shown in table XI No. 6, decomposition of about 6-7%.

TABLE XI.
Acid soluble phosphoric acid.

	Anorg.	Org.	Total
50% Stroma-suspension	:—	—	—
50% Stroma-suspension 11p. Light	—	—	—

Finally I tried to examine whether or not stroma is related to the decomposition of acid soluble phosphorus in the case of hematoporphyrin-insolation treatment of blood cells. I prepared 50% suspension of stroma and examined it for the presence of acid soluble phosphoric acids but such were not discovered.

This suspension was then divided into two parts and one was left for control, while the other was subjected to hematoporphyrin-insolation treatment for the same duration of time. Protein in both solutions was removed by the addition of trichloroacetic acid, and the filtrate was tested for phosphoric acid, but neither it nor nitrogen was found. Thus it becomes clear that although in the time as given in these experiments the stroma was disintegrated

by the action of hematoporphyrin-insolation treatment, it was not accompanied either by the formation of inorganic phosphoric acid or by the decomposition of protein. This results together with that obtained in the experiment described under section I, strongly indicates that the disintegration of stroma is caused by the dissolution of colloid chemical association between protein and lipid.

IX. INFLUENCE OF HEMATOPORPHYRIN-INSOLATION ON DIPHOSPHOGLYCERIC ACID.

As was demonstrated in previous chapters the action of hematoporphyrin insolation on red blood corpuscles leads to the decomposition of the acid soluble phosphoric acids contained in endosoma, while there is no production of phosphoric acids from stroma. In this section investigation on the action of hematoporphyrin-insolation treatment on diphosphoglyceric acid is reported as the latter, according to Jost (1927), constitutes the far greatest part of acid soluble phosphoric acids included in the blood corpuscles. I prepared diphosphoglyceric acid, according to the description by Jost. To 10 cc. of the solution with 0.128 mg. of P and at pH = 7.3 — 7.4, 05 cc. of 0.2% hematoporphyrin solution was added and the mixture was exposed for 2 hours to sunlight. On examination no trace of inorganic phosphorus was discovered, indicating that diphosphorglyceric acid prepared after the method of Jost is not decomposed by hematoporphyrin-insolation treatment. However this is not sufficient to warrant a general deduction that organic acid soluble phosphoric acids are not decomposed inside the cell. There is also possibility enough that during the preparation the said diphosphorglyceric acid changed to its more stable form.

CONCLUSION.

1. When red blood corpuscles are hemolysed by exposure to light in presence of hematoporphyrin, no substance is observed which is capable of producing hemolysis.

2. Hematoporphyrin in a dilute solution is adsorbed by erythrocytes, while in concentrated solution it seems to combine with them.

3. Hematoporphyrin-insolation treatment increases the permeability of the cell membrane, presumably being produced by the disintegration of the stroma.

4. The action of hematoporphyrin-insolation on the disintegration of erythrocytes stroma has a definite relation to the Rywosh series; in the middle of that scale, where both protein and cholesterol are present in intermediate amount, resistance is the weakest.

5. Hemolysis caused by the hematoporphyrin-insolation treatment is often met with corpuscles with high content of acid soluble phosphoric acids, being accompanied by the decomposition of organic phosphoric acids. But this change is going on only in the endosoma and is not originated by the decomposition of the stroma. In the disintegration of the stroma neither decomposition of inorganic phosphoric acid nor that of proteins occur.

6. Probably hemolysis is dependent on the disintegration of the colloid-chemical structure of the proteins and lipoids of the stroma. What change occurs in the endosoma of corpuscle and in what degree it takes part in the disintegration of the stroma,—on these questions no conclusive is yet found.

In conclusion, I wish to express my sincere thanks to Prof. Dr. S. Kakiuchi for his valuable assistance and suggestions rendered to me in the prosecution of this work.

REFERENCES.

- Abderhalden (1895): *Z. f. Physiol. Chem.* **25**, 67.
Bell, R. D. and Doisy, E. A. (1920): *Journ. of Biol. Chem.* **44**, 55.
Bloor (1918): *Journ. of Biol. Chem.* **36**, 33.
Bloor (1916/17): *Journ. of Biol. Chem.* **24**, 227; **29**, 437.
Bloor, Pelkan and Allen (1922): *Journ. of Biol. Chem.* **52**, 191.
Briggs, A. P. (1922): *Journ. of Biol. Chem.* **53**, 13.

- Briggs, A. P. (1924): Journ. of Biol. Chem. **59**, 255.
Fiske and Y. Subbarow (1925): Journ. of Biol. Chem. **66**, 375.
Hans Jost (1927): Z. f. Physiol. Chem. **165**, 171.
Hausmann, W. (1908): Biochem. Z. **14**, 273; **15**, 12.
Hausmann, W. (1911): Biochem. Z. **30**, 276.
Nencki, M. u. Zaleski, J. (1900): Z. f. Physiol. Chem. **30**, 384.
Ohta, K. (1924): Journ. of Biochem. **4**, 225.
Ohta, K. (1925): Journ. of Biochem. **4**, 463.
Rymosh (1907): Pflüger's Arch. **116**, 229.
Whitehorn, J. C. (1924): Journ. of Biol. Chem. **62**, 133.

BEITRÄGE ZUR EMBRYOCHEMIE DER REPTILIEN.

VON

MASAJI TOMITA.

*(Ausgeführt mit Mitteln der Kaiserlichen Akademie zur Förderung
der Wissenschaften.)*

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut in Nagasaki.)

(Eingegangen am 18. Dezember 1928.)

I

Eine der Hauptbedingungen jeder erfolgreichen Untersuchung der sich entwickelnden Eier ist die peinlich genaue Kenntnis der einschlägigen biochemischen Fragen. Obwohl die Eier der Säugetiere und Amphibien so klein sind, dass sie sich der genauen Untersuchung entziehen, so gehören doch die der Vögel und Reptilien zu den bequemsten Ausgangsmaterialien, die dem physiologischen Chemiker überhaupt zu Gebote stehen. Nachdem wir schon seit Jahren ziemlich ausgedehnte chemische Untersuchungen bei der Bebrütung des Hühnereies ausgeführt haben (1921–1927), kann man mit vollem Rechte erwarten, dass die gleichen Untersuchungen auch für die Reptilieneier wertvolle Resultate liefern werden.

Die Eier mancher Reptilien sind leicht in grösseren Mengen zu beschaffen und bequem zu untersuchen. Zu einen solchen wird in erster Stelle das Ei der Meerschildkröte gezählt.

Die Meerschildkröte, *Thalassochelys corticata* (*Chelonia caauana*) bewohnt hauptsächlich den atlantischen Ocean und das Mittelmeer, kommt aber auch in den Sommermonaten an den sandigen Küsten des südlichen Japans vor und legt dort jährlich ihre Eier ab. In der finsternen Nacht steigen die Tiere ans Land, schleppen ihren schweren Körper auf die Sandküste hinauf, graben ein Loch, legen ihre Eier hinein, füllen es wieder mit Sand, den sie fest stampfen und kehren eilig wieder ins Meer zurück. Die

Legezeit der Meerschildkröte beginnt bei uns meistens Mitte Juni und währt höchstens bis Mitte August. Die Tiere legen gewöhnlich 10 bis 14 Dutzend Eier. Die Jungen schlüpfen je nach der Temperatur nach Verlauf von 6–8 Wochen aus. Bei unseren Untersuchungen dauerte die Bebrütung fast immer 47 Tage. Das Ei hat eine biegsame oder lederartige Schale; es ist ganz rund wie eine Pingpong-Kugel und etwas kleiner als ein Hühnerei.

Bei einer glücklichen Gelegenheit konnten wir im vorigen Sommer über zehntausend Eier der Meerschildkröte von der Fukiage-Küste in der Präfektur Kagoshima bekommen und haben diese hauptsächlich bei den ausgedehnten chemischen Untersuchungen verwendet.

Für die Sammlung der Eier und Pflege bei der Bebrütung, sowie Beobachtungen und Mitteilungen an Meerschildkröten sage ich Herrn Jugo Furugaki, dem Landbesitzer der betreffenden Gegend, meinen besten Dank für seine liebenswürdige Unterstützung. Der Kaiserlichen Akademie sei ebenso ehrerbietig für Gewährung eines Stipendiums gedankt.

II

Die Schale bildet mehr oder weniger eine pergamentartig derbe Umhüllung des eigentlichen Eies. Das Gewicht der gereinigten Schale beträgt ungefähr 5,5% des Gesamtgewichts vom unbebrüteten Ei. Im Verlauf der Bebrütung entwicklungsfähiger Embryonen wird die Schale teilweise abgebaut und zum Aufbau des Embryos verwendet. Chemisch bestehen die Eierschalen der Meerschildkröte zum überwiegenden Teil aus anorganischer Substanz und zwar CaCO_3 .

Was das Gewicht der Eier betrifft, so zeigt es keine grosse Schwankungen. Bei meinen Untersuchungen habe ich als Mittelwert für 100 Eier 34,4 g gefunden. Das Verhältnis von Schale, Eierklar und Eidotter und die Zusammensetzungen derselben können kurz in folgenden Tabellen zusammengestellt werden.

Verhältnis von Schale, Eierklar und Eidotter.

Eigewicht g.	32,1–37,5	Mittel 34,4	Prozent
Schale	1,5–3,0	2,0	5,8
Eiweiss	13,2–14,0	13,5	39,2
Eigelb	18,5–19,3	18,9	55,0

Auf ein Ei berechnet verteilen sich die Nährstoffe wie folgt:
 von einem Ei $\left\{ \begin{array}{l} 13,5 \text{ g. Eiweiss} \\ 18,9 \text{ g. Eigelb.} \end{array} \right.$

	Wasser g.	Trocken- substanz g.	Stickstoff- substanz g.	Fett g.	Stickstoff- freie Extrakt- stoffe g.	Salze g.
Eiweiss	13,30	0,20	0,04	1,65	2,81	0,08
Eigelb	13,75	5,15	0,55			0,22

In der Asche wurden Phosphorsäure, Schwefelsäure, Chlor, Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium und Kieselsäure konstatiert.

Unter den stickstofffreien Extraktstoffen wurde eine gärende Zuckerart gefunden, deren Menge äusserst klein war. Im Eierklar ist der Traubenzucker nur spurweise vorhanden. Im Dotter dagegen ist der Zuckergehalt viel grösser als im Eiweiss. Der Eidotter enthält durchschnittlich 18 mg. Traubenzucker.

Nach Angabe von J. Yoshikawa (1913) wurde d-Milchsäure polarimetrisch ermittelt. Im Eierklar ist d-Milchsäure nur 0,003% vorhanden. Die im Dotter vorhandene Fleischmilchsäure ist ebenfalls klein und lässt sich zu 0,012% als Mittel angeben.

Bei der Ermittlung des Gesamt- und Reststickstoffes stellte sich bemerkenswerterweise heraus, dass die Gesamtstickstoffmenge des Meerschildkröteneies im Vergleich zu dem Hühnerei auffallend gering ist und dass die Menge der durch Phosphorwolframsäure

fällbaren Reststickstoffformen viel weniger ist, während der Gehalt an Gesamtreststickstoff und Aminostickstoff beider Tierarten untereinander nicht sehr verschieden ist.

Die einzelnen Versuchsergebnisse stimmten immer gut miteinander überein. Es folgt hier eine Tabelle, die die in den verschiedenen Versuchen erhaltenen Mittelwerte an Gesamt- und Reststickstoff im Meerschildkrötenei enthält.

	Gesamt- stickstoff %	Gesamt- Rest- stickstoff %	Rest-N durch PWS fällbaren Natur %	Amino-N. nach van Slyke. %
Eierklar u. Dotterhaut	0,290	0,014	—	—
Dotter	2,910	0,033	0,003	0,004

Es ergibt sich weiter, dass die Menge der im Eierklar des Meerschildkröteneies frei und gebunden vorhandenen lebenswichtigen Aminosäuren auffallend gering ist, während deren Gehalt im Dotter im Vergleich zu dem Hühnerei ungefähr gleich ist.

Die Befunde können kurz in folgender Tabelle prozentisch zusammengestellt werden.

	Tryp- tophan	Tyrosin	Cystin	Arginin	Histidin	Lysin	Purin- basen
Eierklar	0	0,103	0,123	0,032	0,009	0,009	0
Eidotter	0,055	0,153	0,201	1,089	0,201	1,354	0,003

III

Wie zu erwarten, laufen die im Eiinhalt während der Bebrütung nachweislichen chemischen Prozesse auf eine Überführung der vorhandenen Vorratsstoffe des Eiinhaltes in die in der Bildung

der entsprechenden Gewebe und Organe des Keimlings hinaus. Man bestimmt sie also grundsätzlich durch successive Analyse des Eiinhaltes auf die in Frage kommenden Substanzen im Laufe der Eientwicklung.

Neben den Umsetzungen, welche den energetischen Bedürfnissen des Keimlings dienen, spielen die auf seinen Baustoffwechsel gerichteten eine beträchtliche Rolle; an ihnen sind unter den organischen Bestandteilen des ursprünglichen Eiinhaltes quantitativ in erster Linie die Eiweisse und die Lipoide beteiligt.

Der Kohlehydratumsatz im Meerschildkrötenei steht nicht im Vordergrund, da das Ei nur geringe Mengen freier Kohlehydrate zur Verfügung hat. Der im frischen Dotter wenig vorhandene Traubenzucker (18 mg.) erfährt während der Bebrütung eine allmähliche Abnahme und bei 30 tägiger Bebrütung sinkt der Zuckergehalt auf eine so geringfügige Menge, dass man die Menge nicht mehr ermitteln kann.

In Bezug auf die Proteinsubstanzen hat sich für die Entwicklung des Eies ergeben, dass sich eine Synthese von Harnstoff sicherlich vollzieht, während die Harnsäure nicht in wesentlicher Menge gebildet wird.

Der Gehalt des Meerschildkröteneies wurde möglichst zerkleinert und mit Alkohol versetzt, der Rückstand wiederholt im Alkohol aufgenommen. Die alkoholischen Auszüge wurden eingedampft, in Wasser gelöst, ein aliquoter Teil davon für die Bestimmung des Harnstoffes entnommen. Der in Alkohol unlösliche Rückstand wurde mit Äther behandelt und die getrocknete Masse mit 0,4% Lithiumcarbonatlösung rückfließend extrahiert und zur Ermittlung der Harnsäure verwendet.

Der Harnstoff wurde mit der bekannten Urease-methode bestimmt. Für Ermittlung der Harnsäure wurde das colorimetrische Verfahren von Folin und Wu (1919) angewandt.

Der Übersichtlichkeit und der Einfachheit halber stellte ich in folgender Tabelle die Resultate, die Mittelwerte des Harnstoffes und der Harnsäure auf ein Ei berechnet, zusammen.

Bebrütungs- dauer in Tagen	Gewicht des verwendeten Eiinhalt g	Menge des Harnstoffes		Menge der Harnsäure	
		g	%	mg.	mg./100 g
Frisch	35,2	0,0020	0,0056	0,00	0,00
15	36,3	0,0037	0,0101	0,17	0,46
30	34,0	0,0100	0,0294	0,10	0,29
45	40,0	0,0245	0,0612	0,15	0,37

Nicht ohne Interesse ist die Bildung der in der Glutathionfraktion auftretenden Substanz im Meerschildkrötenei bei der späteren Bebrütungsperiode. Nach Angabe von Tunnicliffe (1925) wurde der getrocknete Eiinhalt mit 10% Trichloressigsäure extrahiert und die in Frage kommende Substanz jodometrisch ermittelt. Dabei wurden aus einem 30 Tage lang bebrüteten Ei 0,15 mg und aus einem 45 Tage lang bebrüteten 0,81 mg festgestellt.

LITERATUR.

- Forin u. Wu (1919), *Jl. of Biol. Chem.* **38**, 459.
 Kamei (1927), *Zs. f. physiol. Chem.* **171**, 101.
 Komori (1926), *Jl. of Biochem.* **6**, 129.
 Komori (1926), ebendasselbst, **6**, 1.
 Nakamura (1928), *Zs. f. physiol. Chem.* **177**, 34.
 Sagara (1928), *Zs. f. physiol. Chem.* **178**, 298.
 Sendju (1925), *Jl. of Biochem.* **5**, 391.
 Sendju (1927), ebendasselbst, **7**, 175-196.
 Takahashi (1928), *Zs. f. physiol. Chem.* **178**, 291-297.
 Tomita (1921), *Bioch. Zs.* **116**, 1-47.
 Tunnicliffe (1925), *Biochem. Jl.* **19**, 194.
 Yoshikawa (1913), *Zs. f. physiol. Chem.* **87**, 382.

BEITRÄGE ZUR EMBRYOCHEMIE DER REPTILIEN. II.

VON

MASAJI TOMITA und MITARBEITERN.

*(Ausgeführt mit Mitteln der Kaiserlichen Akademie zur Förderung der
Wissenschaften.)*

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen
Akademie in Nagasaki.)*

(Eingegangen am 18. Dezember 1928.)

Über das Verhalten des im Reptilienei vorhandenen Reststickstoffes bei der Bebrütung.

VON

YASUO NAKAMURA.

Die in der früheren Abhandlung (1921) an den Hühnereiern mitgeteilten Erfahrungen über das Verhalten der Reststickstoffformen bei der Bebrütung werden im folgenden auf Reptilieneier angewandt und weiter entwickelt.

Um die Mengenverhältnisse der Reststickstoffformen gegenüber dem Gesamtstickstoff zu finden, habe ich zuerst die Gesamtstickstoffmenge der einzelnen Teile des Eies auf bekannte Weise ermittelt.

Eierklar, Dotter, Weissdotter und Dotterhaut und das bei den sich entwickelnden Eiern erscheinende Allantois- und Amnioswasser und Embryo wurden sorgfältig getrennt. Das Embryo wurde zuerst mit der Schere zerkleinert, in der Reibschale zerrieben und mit konzentrierter Schwefelsäure behandelt. Die anderen Teile wurden sofort mit Schwefelsäure in der Hitze gelöst. Die schwefelsaure Lösung wurde in einen geeigneten Kolben gefüllt. Ein aliquoter Teil davon wurde dann verascht und weiter kjeldahlisiert.

Die Ermittlung des Reststickstoffes geschah genau so wie bei den Hühnereiern. Ausser dem Dotter und Embryo wurden dabei das Eierklar, die Dotterhaut, der Weissdotter, das Amnios- und Allantoiswasser zugleich untersucht.

Das Bestehen chemischer Umsetzungen der Stickstoffformen in keimenden Eiern der Meerschildkröte äussert sich vor allem durch eine deutliche Zunahme des Reststickstoffes und einen geringen Verlust des Gesamtstickstoffes.

EXPERIMENTELLES.

1. Stickstoffgehalt.

Die einzelnen Versuchsergebnisse bei allen Bebrütungsperioden stimmten immer sehr gut miteinander überein. Es folgt hier eine Tabelle, die die in den verschiedenen Versuchen erhaltenen Mittelwerte an Gesamtstickstoff im Meerschildkrötenei enthält.

TABELLE I.

Bebrütungsdauer in Tagen	Eierklar u. Dotterhaut		Dotter		Weissdotter, Amnios- u. Allantoisfl.		Embryo		Gesamtes Ei	
	Menge des Materials g	Gesamt-N. g	Menge des Materials g	Gesamt-N. g	Menge des Materials g	Gesamt-N. g	Menge des Materials g	Gesamt-N. g	Gesamt-N.	
									g	%
Frisch	18,7	0,0412	11,4	0,5481	3,3	0,0027	—	—	0,5920	1,77
16	10,5	0,0178	10,8	0,5443	12,5	0,0243	—	—	0,5864	1,73
30	5,8	0,0122	10,4	0,5012	15,1	0,0253	1,1	0,0102	0,5489	1,69
45	—	—	2,6	0,1193	12,7	0,0640	17,5	0,3234	0,5067	1,54

Man sieht, dass die Gesamtstickstoffmenge in dem ganzen Eiinhalt viel weniger ist als die des Vogeleies und dass der Gesamtstickstoff bei der Bebrütung eine geringfügige Abnahme erfährt. Dieser Verlust soll auf Entweichen des Stickstoffes und der stickstoffhaltigen flüchtigen Substanzen beruhen.

2. *Reststickstoff.*

In der enteiussten Lösung der einzelnen Eibestandteile wurde der Stickstoff nach Kjcdahl auf bekannte Weise bestimmt. Dabei wurden der durch Phosphorwolframsäure fällbare Reststickstoff und der nach van Slyke bestimmbare Aminostockstoff zugleich ermittelt. Der Übersichtlichkeit halber sollen die wesentlichen Untersuchungsergebnisse in einer Gesamttabelle kurz prozentisch zusammen mitgeteilt werden.

TABELLE II.

Bebrütungs- dauer in Tagen	Einhalt	Gesamt- Reststick- stoff (%)	Rest-N. d. durch P-W-S. fällbar. Natur (%)	Rest-N. d. durch P-W-S. nicht fällbar. u. nach van Slykescher Methode bestimmbaren Natur (%)
Frisch	Eierklar u. Dotterhaut	0,014	—	—
	Dotter	0,019	0,002	0,002
	Weissdotter	0,014	0,001	0,002
16	Eierklar u. Dotterhaut	0,015	—	0,002
	Dotter	0,019	0,003	0,003
	Weissdotter	0,020	0,002	0,002
30	Eierklar u. Dotterhaut	0,018	—	0,003
	Dotter	0,026	0,005	0,004
	Weissdotter	0,020	0,002	0,003
	Embryo	0,040	—	0,006
45	Dotter	0,189	0,014	0,029
	Amnios- u. Allantoisfl.	0,048	0,003	0,003
	Embryo	0,052	0,007	0,007

Aus den angeführten Befunden ergibt sich, dass die im Meerschildkrötenei vorhandenen Reststickstoffformen sich während der Bebrütung mit fortschreitender Entwicklung des Embryos vermehren. Vergleicht man nun die Resultate mit denen des Hühnerereies, so fällt es auf, dass die Menge des durch Phosphorwolframsäure fällbaren Reststickstoffes sehr gering ist.

LITERATUR.

Tomita, M. (1921), *Biochem. Zeitschr.* **116**, 1-39.

BEITRÄGE ZUR EMBRYOCHEMIE DER REPTILIEN. III.

VON

MASAJI TOMITA und MITARBEITERN.

*(Ausgeführt mit Mitteln der Kaiserlichen Akademie zur Förderung der
Wissenschaften.)*

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen
Akademie in Nagasaki.)*

(Eingegangen am 18. Dezember 1928.)

Über die Bildung von d-Milchsäure bei der Bebrütung von Meerschildkröteneiern.

VON

YUZO SENDJU.

Durch Verfolgung der in bebrüteten Hühnereiern stattfindenden chemischen Veränderungen hat M. Tomita (1921) neues Material zu der Frage nach der Herkunft und der Entstehung der d-Milchsäure im tierischen Organismus beizubringen versucht. Im frischen Hühnerei finden sich im Weissei nur sehr geringe Mengen, im Dotter etwa 0,0318% Milchsäure. Bei der Bebrütung erfolgt in den ersten 5 Tagen eine starke Zunahme der Milchsäure bis zum Höchstwert von 0,0763 bzw. 0,1337%, der im weiteren Verlaufe wieder eine starke Abnahme folgt. Im Zusammenhang mit der Tatsache, dass im Laufe der Bebrütung eine stetige Abnahme des Traubenzuckers eintritt und die Milchsäurebildung durch Glukoseinjektion befördert wird, gewinnt er die Vorstellung, dass der Traubenzucker im bebrüteten Ei zu d-Milchsäure abgebaut wird.

Zwecks Ergänzung der Untersuchungen über Milchsäurebildung bei der Ei-bebrütung sind die folgenden Untersuchungen unternommen worden.

Eierklar, Dotter und Embryo wurden sorgsam getrennt, die beiden ersten sofort und der Embryo erst nach der Zerkleinerung mit Wasser durchgerührt und die gleichmässige Flüssigkeit wurde mit der Schenckschen Lösung enteiweisst. Das Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff behandelt; aus Filtrat vom Schwefelquecksilber wurde der Schwefelwasserstoff unter Durchleiten von Luft vertrieben. Die Flüssigkeit wurde hierauf mit Natriumcarbonat neutralisiert und unter vermindertem Druck stark eingeeengt. Der Rückstand wurde mit einem 10 fachen Volumen 94% Alkohols vermischt und nach 24 stündigen Stehenlassen filtriert. Das Filtrat verdunstet, und der Rückstand wurde mit absolutem Alkohol erschöpfend extrahiert. Von dieser Lösung wurde nun der Alkohol abdestilliert, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und nach Ansäuerung mit Phosphorsäure mit Äther im Kumagawa-Sutosen Extraktionsapparat extrahiert. Der Ätherauszug wurde mit geprühtem Natriumsulfat getrocknet, filtriert, der Äther abdestilliert, der Rückstand in wenig Wasser gelöst, eine halbe Stunde auf dem Wasserbade mit Bleicarbonat erhitzt, filtriert und das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit. Um den gelösten

Bebrütungs- dauer in Tagen	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Materials g		Menge d. d-Milchsäure	
				g	%
Frisch	150	2113 3020	Weissei Dotter	0,0680 0,3669	0,008
15	96	3520	Eiinhalt	1,4592	0,041
37	98	2964 789	Weissei, Embryo, Amnios- u. Allantoisfl. Dotter	0,2661	0,016
45	82	2772	Eiinhalt	0,4196	0,015
Neugeboren	100	1595		0,6225	0,039

Schwefelwasserstoff zu vertreiben, wurde das Filtrat unter vermindertem Druck stark eingeeengt und schliesslich mit reinem Lithiumcarbonat in Lithiumlaktat überführt. Nach Angabe von Junji Yoshikawa (1913) wurden die Konzentration der d-Milchsäure polarimetrisch ermittelt.

Die Resultate der einzelnen d-Milchsäurebestimmungen sind kurz in der Tabelle zusammengestellt worden.

Aus den Versuchsergebnissen geht hervor, dass d-Milchsäure in den ersten 15 Tagen eine bedeutende Zunahme erfährt, der im weiteren Verlaufe wieder eine starke Abnahme folgt. Es fällt hier sofort auf, dass sobald die Jungen ausschlüpfen, eine starke Zunahme der d-Milchsäure bis zum Höchstwert von 0,039% erfolgt.

Vergleicht man nun die in der Tabelle eingetragenen Werte der d-Milchsäure mit denen des bebrüteten Hühnereis, so lässt sich nicht verkennen, dass eine Vermehrung der d-Milchsäure in der ersten Hälfte der Bebrütungsdauer im Hühnerei in viel bedeutenderem Masse erfolgt als im Reptilienei.

LITERATUR.

Tomita, M. (1921), *Biochem. Zeitscher.* **116**, 15.

Yoshikawa, J. (1913), *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **87**, 382.

BEITRÄGE ZUR EMBRYOCHEMIE DER REPTILIEN. IV.

VON

MASAJI TOMITA und MITARBEITERN.

*(Ausgeführt mit Mitteln der Kaiserlichen Akademie zur Förderung der
Wissenschaften.)*

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen
Akademie in Nagasaki.)*

(Eingegangen am 18. Dezember 1928.)

Über das Verhalten der lebenswichtigen Aminosäuren bei der Bebrütung des Meerschildkröteneies.

VON

YUZO SENDJU.

Durch die Ergebnisse unserer chemischen Untersuchungen über die Embryogenese des Hühnereies (1925–1927) kam ich zu der Anschauung, dass sowohl das Tryptophan als auch das Tyrosin und das Cystin bei der Entwicklung des Hühnerembryos sehr wahrscheinlich als Ausgangsmaterial zur Bildung anderer Stoffe Verwendung finden, und dass die in freier sowie in gebundener Form vorhandenen Hexonbasen als solche unentbehrlich sind.

Ich bin dieser Frage nun beim Meerschildkrötenei näher getreten.

Als Untersuchungsmaterial benutzte ich einerseits möglichst gleichgrosse Eier, die von Meerschildkröten derselben Rasse in einer bestimmten Frist gelegt worden waren, und zwar verwendete ich zum Teil frisch befruchtete Eier und zum Teil bebrütete Eier, die 15, 37 und 45 Tage alt waren. Andererseits wurden zugleich die Neugeborenen untersucht.

Für Ermittlung des Tryptophangehaltes wurde dabei das colorimetrische Verfahren von O. Fürth (1920) angewandt. Das Tyrosin wurde nach Angabe von O. Fürth u. Fleischmann (1922) durch Bromadditionsverfahren bestimmt. Durch das von Y. Okuda (1925) angegebene jodmetrische Verfahren habe ich das Cystin ermittelt. Dabei wurde das Cystein samt dem Cystin als Cystin berechnet. Bei der Untersuchung von Hexonbasen wurden die Purinbasen als Silbersalze gefällt und aus dem Filtrat der Silberfällung habe ich die Hexonbasen nach dem Verfahren von Kossel u. Kutscher (1900–1901) für sich allein isoliert. Die näheren Behandlungen geschahen genau so wie bei Hühner-eiern.

Es folgt nun eine Tabelle, welche die in den verschiedenen Versuchen erhaltenen Mittelwerte an Tryptophan, Tyrosin, Cystin, Hexonbasen und Purinbasen im ganzen Ei oder im neugeborenen Jungen enthält.

Bebrütungs- dauer in Tagen	Menge von d. frei und gebunden vorhandenen						
	Tryptophan g	Tyrosin g	Cystin g	Arginin g	Histidin g	Lysin g	Purin- basen g
Frisch	0,0550	0,1735	0,0586	0,2076	0,0331	0,2118	0,0004
15	0,0460	0,1565	0,0516	0,1952	0,0353	0,2015	0,0007
37	0,0396	0,1352	0,0406	0,1930	0,0454	0,1866	0,0027
45	0,0379	0,1149	0,0312	0,1756	0,0466	0,2006	0,0033
Neugeboren	0,0359	0,1152	0,0273	0,1813	0,0476	0,1959	0,0036

Aus den beschriebenen Untersuchungen ergeben sich folgende Schlüsse:

1. Der Gehalt des Meerschildkröteneies an frei und gebunden vorhandener Tryptophan, Tyrosin, Lysin und Purinbasen ist ungefähr die Hälfte beim Hühnerei.
2. Der Gehalt des Meerschildkröteneies an frei und gebunden vorhandener Cystin und Histidin ist noch weniger und beträgt

ungefähr $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{4}$ im Vergleich mit dem Hühnerei, während die Argininmenge beider Tierarten nicht sehr verschieden ist.

3. Bei der Bebrütung nimmt der Gehalt des Meerschildkröteneis an Tryptophan, Tyrosin, Cystin und Arginin allmählich ab. Auf Grund dieser Ergebnisse kann man mit vollem Rechte annehmen, dass während der Bebrütung des Meerschildkröteneies diese Aminosäuren wahrscheinlich als Ausgangsmaterial zur Bildung anderer Stoffe Verwendung finden.

4. Die Gesamtmenge des im Meerschildkrötenei frei und gebunden vorhandenen Lysins bleibt während der Bebrütung beinahe konstant.

5. Bei der Bebrütung erfolgt eine allmähliche Zunahme von Histidin, welches im Meerschildkrötenei frei und gebunden vorhanden ist. Dieses Verhalten trat bei dem Hühnerei nicht deutlich zutage.

6. Aus den angeführten Befunden ergibt sich weiter, dass die im Meerschildkrötenei frei und gebunden vorhandenen Purinstickstoffformen sich während der Bebrütung mit fortschreitender Entwicklung des Embryos vermehren.

LITERATUR.

- Fürth, O. (1920), *Biochem. Zs.* **109**, 193.
Fürth, O. u. Fleischmann (1922), *Biochem. Zs.* **127**, 143.
Kossel, A. u. Kutscher (1900–1901), *Zs. f. physiol. Chem.* **31**, 165.
Okuda, Y. (1925), *Jl. of Biochem.* **5**, 217.
Sendju, Y. (1925), *Jl. of Biochem.* **5**, 391.
Sendju, Y. (1927), *Jl. of Biochem.* **7**, 175 u. 191.

BEITRÄGE ZUR EMBRYOCHEMIE DER REPTILIEN. V.

VON

MASAJI TOMITA und MITARBEITERN.

*(Ausgeführt mit Mitteln der Kaiserlichen Akademie zur Förderung der
Wissenschaften.)*

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen
Akademie in Nagasaki.)*

(Eingegangen am 18. Dezember 1928.)

Über das Verhalten der anorganischen Bestandteile bei der Bebrütung des Meerschildkröteneies.

VON

JUNJI KARASHIMA.

Übersieht man die Literatur über die Bedeutung der Salze für den Organismus, so lässt sich allerdings nicht verkennen, dass die Mehrzahl der Autoren zu der Ansicht neigt, dass die Zufuhr der Nährsalze in erster Reihe und weitaus am stärksten für den wachsenden Organismus notwendig ist.

Überhaupt aber, wo Organisation und Zellbildung stattfindet, da müssen notwendigerweise gewisse anorganische Salze mitwirken. Keine Elementarzelle kann sich ohne anorganische Salze bilden. Es kann also als unbestreitbare Tatsache gelten, dass ein gewisses Mass der Salzzufuhr auch für den sich entwickelnden Embryo der ausserhalb einer mütterlichen nutritiven Sphäre heranwachsenden Tierklassen eine physiologische Lebensbedingung ist.

Wie zu erwarten, finden im Laufe der Eibebrütung eine Mobilisierung und Überführung von anorganischen Bestandteilen des Eiinhaltes in dem werdenden Embryo statt, und es muss dabei besonders darauf hingewiesen werden, wie ausserordentlich verschieden untereinander der Stoffwechsel der einzelnen Mineralbestandteile des Organismus sowohl qualitativ wie quantitativ ist.

offenbar weil sie ganz verschiedenen Zwecken im Körperhaushalt dienen. Diese Unterschiede sind nicht nur in chemischer, sondern auch in physiologischer Hinsicht sehr bedeutsame.

Um einen Beitrag zur Kenntnis des Mineralstoffwechsels des sich entwickelnden Embryos zu liefern, habe ich im Anschluss an bereits mitgeteilte fragmentarische Beobachtungen bei Hühneriern den Versuch unternommen, die anorganischen Bestandteile in ganz verschiedenen Entwicklungsstadien des Meerschildkröteneies möglichst systematisch zu verfolgen. Dabei wurden Eierklar, Dotter, Embryo, Amnios- und Allantoisflüssigkeit sorgfältig abgetrennt und jede für sich besonders bearbeitet. Je nach der Menge des verwendeten Materials wurden zu Versuchen manchmal über 100 Stück Eier gebraucht.

TABELLE I.

Bebrütungs- dauer	Menge der Substanz g		Trockensubst.		Org. Subst.		Anorg. Subst.	
			g	%	g	%	g	%
Frisch	Klar	1350	20,01	16,46	11,45	15,56	8,56	0,90
	Dotter	1895	514,25		492,59		21,66	
15 Tage	Klar	709	11,11		7,56		3,55	
	Dotter	2664	568,19	15,34	542,01	14,56	26,18	0,78
	Embryo	4	0,31		0,27		0,04	
30 Tage	Klar mit Dotterhaut	536	15,61		12,22		3,39	
	Dotter	2252	469,36	14,76	451,12	14,01	18,24	0,75
	Embryo	141	9,38		8,15		1,23	
	Allantois- u. Amniosfl.	446	3,66		1,16		2,50	
45 Tage	Klar	0	0		0		0	
	Dotter	500	224,44		217,89		6,55	
	Embryo	1525	262,60	11,39	236,69	10,54	25,91	0,85
	Allantois- u. Amniosfl.	2380	14,61		9,57			
Neugeboren		2125	469,81	22,18	431,59	20,31	38,22	1,87

Soweit nun zunächst die quantitative Analyse sich auf die festen Stoffe bezieht, hat sie vorhergehende Zusammensetzung ergeben.

Bei Betrachtung der soeben angeführten Tabelle sieht man, dass der Aschengehalt, abgesehen von Neugeborenen, in der ganzen Bebrütungsperiode keine grosse Ab- und Zunahme erfährt.

Die quantitative Zusammensetzung der einzelnen Mineralbestandteile lässt sich zunächst der Übersichtlichkeit halber am besten aus folgender Zusammensetzung übersehen.

TABELLE II.

Bebrütungs- dauer	Mineralbestandteile im ganzen Eiinhalt %								
	K ₂ O	Na ₂ O	CaO	MgO	P ₂ O ₅		SO ₃	Cl	SiO ₂
					anorg.	org.			
Frisch	0,117	0,186	0,061	0,028	0,006	0,342	0,267	0,140	0,021
15 Tage	0,108	0,165	0,066	0,038	0,013	0,280	0,236	0,156	0,018
30 Tage	0,109	0,126	0,068	0,036	0,015	0,266	0,246	0,085	0,031
45 Tage	0,081	0,135	0,131	0,108	0,123	0,106	0,154	0,099	0,015
Neugeborenen	0,108	0,181	0,476	0,289	0,365	0,052	0,162	0,133	0,022

Stellt man die Einzelbestandteile der Aschen bei der Bebrütung einander gegenüber, so findet sich in dem späteren Stadium der Bebrütung eine beträchtlichere Vermehrung des Kalks und des Magnesiums. Diese Ergebnisse deuten darauf, dass die Schale teilweise abgebaut und zum Aufbau des Embryos verwendet wird, da von aussen keine Zufuhr erfolgt.

Es ergab sich weiter als wesentlicher Befund, dass die anorganische Phosphorsäure während der Entwicklung in bedeutendem Masse zunimmt, während der Gehalt des Eiinhaltes an Gesamtphosphor in der ganzen Periode nicht in breiten Grenzen schwankt. Die organischen Phosphorverbindungen dienen also als Phosphorquelle für die Skelettverkalkung des Embryos, dies wird besonders deutlich vom 45 Bebrütungstage an.

Eine Mobilisierung und Überführung von einzelnen anorganischen Bestandteilen des Eiinhaltes in dem werdenden Embryo sind leicht aus folgenden Tabellen ersichtlich.

TABELLE III.

K₂O

Bebrütungs- dauer	Auf 100 Teile Eiinhalt kommen im				
	Weissei u. Dotterhaut	Dotter	Embryo	Allantois- u. Amniosfl.	ganzen Ei
Frish	0,0409	0,0764	—	—	0,1175
15 Tage	0,0231	0,0853	0,0002	—	0,1086
30 Tage	0,0174	0,0599	0,0078	0,0154	0,1005
45 Tage	—	0,0139	0,0543	0,0132	0,0814

TABELLE IV.

Na₂O

Bebrütungs- dauer	Auf 100 Teile Eiinhalt kommen im				
	Weissei u. Dotterhaut	Dotter	Embryo	Allantois- u. Amniosfl.	ganzen Ei
Frish	0,1150	0,0718	—	—	0,1868
15 Tage	0,0530	0,1123	0,0003	—	0,1656
30 Tage	0,0313	0,0663	0,0082	0,0208	0,1266
45 Tage	—	0,0078	0,1023	0,0250	0,1351

TABELLE V.

CaO

Bebrütungs- dauer	Auf 100 Teile Eiinhalt kommen im				
	Weissei u. Dotterhaut	Dotter	Embryo	Allantois- u. Amniosfl.	ganzen Ei
Frish	0,0019	0,0593	—	—	0,0612
15 Tage	0,0038	0,0623	0,0001	—	0,0662
30 Tage	0,0026	0,0626	0,0012	0,0022	0,0686
45 Tage	—	0,0109	0,1101	0,0105	0,1315

TABELLE VI.

MgO

Bebrütungs- dauer	Auf 100 Teile Eiinhalt kommen im				
	Weissei u. Dotterhaut	Dotter	Embryo	Allantois- u. Amniosfl.	ganzen Ei
Frisch	0,0024	0,0260	—	—	0,0284
15 Tage	0,0035	0,0347	0,0001	—	0,0383
30 Tage	0,0031	0,0306	0,0013	0,0017	0,0367
45 Tage	—	0,0027	0,0957	0,0101	0,1085

TABELLE VII.

P₂O₅

Bebrü- tungs- dauer	Arten des Phosphors	Auf 100 Teile Eiinhalt kommen im				
		Weissei u. Dotter- haut	Dotter	Embryo	Allan- tois- u. Amniosfl.	ganzen Ei
Frisch	Gesamt-P.	0,0049	0,3432			0,3481
	anorg. P.	0,0027	0,0033	—	—	0,0060
	org. P.	0,0022	0,3399			0,3421
15 Tage	Gesamt-P.	0,0076	0,2860	0,0004		0,2940
	anorg. P.	0,0075	0,0061		—	0,0136
	org. P.	0,0001	0,2799			0,2804
30 Tage	Gesamt-P.	0,0051	0,2695	0,0055	0,0017	0,2818
	anorg. P.	0,0029	0,0069	0,0048	0,0010	0,0156
	org. P.	0,0022	0,2626	0,0007	0,0007	0,2662
45 Tage	Gesamt-P.		0,0898	0,1403	0,0067	0,2368
	anorg. P.	—	0,0047	0,1138	0,0051	0,1236
	org. P.		0,0851	0,0265	0,0016	0,1132

TABELLE VIII.

 SO_3

Bebrütungs- dauer	Auf 100 Teile Eiinhalt kommen im				
	Weissei u. Dotterhaut	Dotter	Embryo	Allantois- u. Amniosfl.	ganzen Ei
Frisch	0,0155	0,2031	—	—	0,2186
15 Tage	0,0084	0,1819	0,0000	—	0,1903
30 Tage	0,0101	0,1852	0,0012	0,0046	0,2011
45 Tage	—	0,0694	0,0510	0,0058	0,1262

TABELLE IX.

Cl

Bebrütungs- dauer	Auf 100 Teile Eiinhalt kommen im				
	Weissei u. Dotterhaut	Dotter	Embryo	Allantois- u. Amniosfl.	ganzen Ei
Frisch	0,1160	0,0244	—	—	0,1404
15 Tage	0,0316	0,0855	0,0002	—	0,1173
30 Tage	0,0317	0,0130	0,0092	0,0320	0,0859
45 Tage	—	0,0002	0,0563	0,0433	0,0998

TABELLE X.

 SiO_2

Bebrütungs- dauer	Auf 100 Teile Eiinhalt kommen im				
	Weissei u. Dotterhaut	Dotter	Embryo	Allantois- u. Amniosfl.	ganzen Ei
Frisch	0,0015	0,0200	—	—	0,0215
15 Tage	0,0005	0,0184	0,0000	—	0,0189
30 Tage	0,0002	0,0308	0,0002	0,0002	0,0314
45 Tage	—	0,0126	0,0026	0,0002	0,0154

BEITRÄGE ZUR EMBRYOCHEMIE DER REPTILIEN. VI.

VON

MASAJI TOMITA und MITARBEITERN.

*(Ausgeführt mit Mitteln der Kaiserlichen Akademie zur Förderung der
Wissenschaften.)*

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen
Akademie in Nagasaki.)*

(Eingegangen am 18. Dezember 1928.)

Über das Verhalten der Fette bei der Bebrütung von Meerschildkröteneiern.

VON

JUNJI KARASHIMA.

Neben den Umsetzungen des Fettes, welche den energetischen Bedürfnissen des Keimlings dienen, spielen die auf seinen Baustoffwechsel gerichteten eine beträchtliche Rolle.

Es ist also nicht ohne Interesse zu entscheiden, ob das Fett sich während der Bebrütung in seiner Zusammensetzung und Eigenschaft ganz gleichmässig verhält, oder ob es dabei Veränderungen erfährt.

Wenn von diesem Standpunkte aus die Zusammensetzung etwa in Hinsicht auf Fettabbau und Fettaufbau interessiert, muss man ein möglichst vollständiges und übersichtliches Bild von der Art und relativen Menge der Komponenten eines Fettes haben. Dazu sind die Kennzahlen in ihrer alten Form nicht fähig. Dies Verhalten näher zu beleuchten, wird durch Ermittlung der Kennzahlen von Bamberger (1927) beabsichtigt, die sich ja alle nur auf Fettsäuren beziehen, in einer einzigen Einheit auszudrücken, und zwar in einer, die zugleich den Zusammenhang mit der organi-

schen Chemie vermittelt, und dann die einzelnen Komponenten mit der Gesamtzahl der Fettsäuren zu vergleichen.

Als Untersuchungsmaterial verwendete ich dabei zum Teil frische Eier, die von Meerschildkröten derselben Rasse in einer bestimmten Frist gelegt worden waren, und zum Teil ihre bebrüteten Eier, die 15, 30 und 45 Tage alt waren. Zugleich wurden die Neugeborenen untersucht.

Die Befunde kann man in Kürze folgendermassen tabellarisch zusammenfassen:

TABELLE I.
Prozentzusammensetzungen.

Bebrütungs- dauer	Gehalt an Fett in 100 Eiern g	Gesamte Fett- säure %	Freie Fett- säuren %	Flüchtige wasser- lösliche Fettsäuren %	Flüchtige wasser- unlösliche Fettsäuren %	Doppel- bindungen in % der Carboxyl- gruppen
Frisch	164,5	100	2,4	0,8	0,6	87,5
15 Tage	168,0	100	32,6	0,9	0,5	82,2
30 Tage	163,0	100	23,4	0,9	0,8	92,2
45 Tage	136,5	100	26,6	0,8	0,7	91,7
Neugeborene	111,2	100	19,7	1,1	0,8	94,3

TABELLE II.
Millimolzahl der Fettsäuren.

Bebrütungs- dauer	Gehalt an Fett in 100 Eiern g	Millimol Fettsäuren in 1 g Fett				
		Gesamte Fett- säure	Freie Fett- säuren	Flüchtige wasser- lösliche Fettsäuren	Flüchtige wasser- unlösliche Fettsäuren	Un- gesättigte Fettsäuren
Frisch	164,5	3,527	0,083	0,029	0,022	3,089
15 Tage	168,0	3,697	1,205	0,032	0,018	3,039
30 Tage	163,0	3,699	0,865	0,034	0,030	3,409
45 Tage	136,5	3,414	0,962	0,026	0,024	3,130
Neugeborene	111,2	3,324	0,656	0,035	0,026	3,134

Blickt man nun auf die in den Tabellen eingetragenen Fettmengen, so fällt auf, dass das Gesamtfett im ganzen Ei im späteren Entwicklungsstadium eine erhebliche Abnahme erfährt. Was nun die Zusammensetzung des Fettes betrifft, so bemerkt man, dass nach der 15 tägigen Bebrütung eine beträchtliche Zunahme der freien Fettsäuren erfolgt. Die Annahme, dass die freien Fettsäuren teils als Oxydationsprodukte der fettfreien Bestandteile des Eihalthes zu finden sind, ist dabei ganz ausgeschlossen, denn der Gehalt an Gesamtfettsäure bleibt immer konstant.

LITERATUR.

Bamberger (1927), Biochem. Zs. **190**, 247.

BEITRÄGE ZUR EMBRYOCHEMIE DER REPTILIEN. VII.

VON

MASAJI TOMITA und MITARBEITERN.

*(Ausgeführt mit Mitteln der Kaiserlichen Akademie zur Förderung der
Wissenschaften.)*

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen
Akademie in Nagasaki.)*

(Eingegangen am 18. Dezember 1928.)

Über Fermente im Meerschildkrötenei.

VON

JUN-ICHIRO SAGARA,

Wir begegnen den Fermenten überall da, wo Lebensvorgänge sich abspielen. Man ist daher berechtigt, an die Möglichkeit zu denken, dass alle tiefgehenden, chemischen Umsetzungen, welche sich in bebrüteten entwicklungsfähigen Eiern abspielen, an bestimmte Fermentwirkungen geknüpft sein könnten.

Im Hinblick auf embryologische Gesichtspunkte war es nun interessant zu entscheiden, in welchen Entwicklungsstadien sich die verschiedenen Fermente zum erstenmal nachweisen lassen und in welchem Teil des Eies sie ihren Sitz haben.

Zu dem Zwecke haben E. Abderhalden und E. Steinbeck (1910) einerseits die verschiedenen Entwicklungsstadien des Hühnchens untersucht und ferner Schweinembryonen verschiedenen Alters geprüft. Von besonderem Interesse ist dabei, dass die Fermente in der Entwicklung der Organismen zum Teil frühzeitig auftreten. Beim Hühnchen liessen sich in den Geweben am 7. oder 8. Tage zum erstenmal peptolytische Fermente nachweisen. Bei Schweinembryonen waren vom 40. Tage an solche Fermente feststellbar.

Andererseits wurden von J. Wohlgemuth (1905) sowohl mit Eiweiss wie mit Dotter autolytische Versuche gesondert angestellt und die Untersuchungen ergaben die Anwesenheit eines proteolytischen, eines lipolytischen und eines chromolytischen Fermentes im Dotter. Unter den Kohlehydratspaltenden Fermenten wurde ein diastatisches von Müller und Masuyama (1900) im Dotter gefunden. Stepanek (1904) fand ein glykolytisches, das je aerob und anaerob verschieden wirkt. H. Roger (1908) wies endlich im Eiweiss und Eigelb eine Amylase nach. Eingehende Untersuchungen von Y. Komori (1924) im hiesigen Institut ergaben ferner die Anwesenheit eines diastatischen im Eiweiss, Dotter und Embryo, eines lipolytischen und Nukleinsäure spaltenden im Dotter und Embryo und eines tryptischen Ferment im Dotter. Er hat ferner konstatiert, dass Arginase zum erstenmal am 14. Tage im Embryo auftritt.

Es schien nun wichtig, festzustellen, ob die Quantitäten der Fermente in der Zeit der Bebrütung eine Änderung erfahren. Bereits im Jahre 1892 hatte Heim in dieser Hinsicht interessante Versuche mit Eiern von Crustacees decapodes angestellt. Auf diese Frage ist Koga (1923) näher eingegangen und er hat die Fermentverhältnisse auch während des Ausbrütens beim Hühnerei untersucht.

Um die Untersuchungen über Fermentwirkung bei den sich entwickelnden Eiern zu ergänzen und um ferner das Verhalten bei Vogel- und Reptilieneiern zu vergleichen, habe ich das Studium der Fermente im Meerschildkrötenei unternommen.

Die Versuchsordnung ist dieselbe wie sie bei der Arbeit von Y. Komori ausführlich beschrieben worden ist.

Das Eiweiss, der Dotter und der Embryo wurden jedesmal gesondert verarbeitet. Sie wurden sorgfältig getrennt, Eierklar und Dotter sofort, der Embryo erst nach der Zerkleinerung mit Wasser versetzt und die gleichmässige Flüssigkeit wurde in 2 gleiche Portionen geteilt, wovon die eine mit der Sublimatlösung durchgemischt und unter Zusatz von Toluol bei 37–38° digeriert

wurde. Die andere Portion wurde jedesmal unter Innehaltung identischer Bedingungen für die Kontrollversuche der bei der Autolyse von Organmaterial allein auftretenden Umsetzung verwendet. Selbstverständlich wurde noch eine Kontrollbestimmung zur Konstatierung der Tatsache vorgenommen, dass eine gleich grosse digerierte wässrige Lösung von Substraten gänzlich ungespalten blieb.

Arten der Fermente	Bebrütungs- dauer in Tagen	Digestions- dauer in Stunden	Eierklar	Dotter	Embryo
Diastase	Frisch	24	+	++	
	15	24	+	++	
	30	24	+	++	+
	45	24		+++	+
	Neugeboren	24			+++
Lipase	Frisch	24-48	—	+	
	15	24-48	—	+	
	30	24-48	—	++	+
	45	24-48		+++	+
	Neugeboren	24-48			+++
Nuklease	Frisch	24	—	+	
	15	24	+	+	
	30	24	+	+	+
	45	24		+++	+
	Neugeboren	24			+++
Trypsin	Frisch	168	±	++	
	15	168	±	++	
	30	168	±	++	—
	45	168		++	+
	Neugeboren	168			+++

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen sind in der Tabelle kurz schematisch verzeichnet.

LITERATUR.

- Abderhalden u. Steinbeek (1910), Zeitschr. f. physiol. Chem. **68**, 312.
Heim (1892), Soc. biol. **44**, 467.
Koga (1923), Biochem. Zs. **141**, 430.
Komori (1924), Jl. of Orient. medicin. **2**, 37.
Müller u. Masuyama (1900), Zs. f. Biol. **39**, 547.
Roger (1908), Jl. de physiol. et de pathol. gén. **1908**, 794.
Stepanek (1904), Cbl. Physiol. **18**, 188.
Wohlgemuth (1905), Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 540.